



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

## DIVISIÓN DE INGENIERÍA

### POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

#### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO ESPACIO- TEMPORAL DE PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS EN LA CIUDAD DE HERMOSILLO, SONORA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

ÁLVARO SANTOS ROMO

Hermosillo, Sonora

Diciembre 2014

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# UNIVERSIDAD DE SONORA

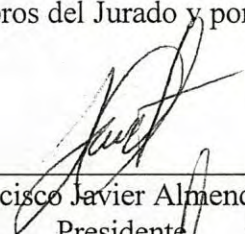
## APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

**ÁLVARO SANTOS ROMO**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

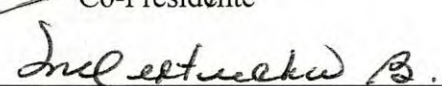
21 de Noviembre de 2014

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia  
Presidente

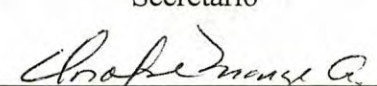
21 de Noviembre de 2014

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge Hernández López  
Co-Presidente

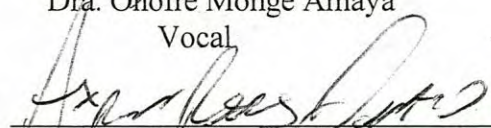
21 de Noviembre de 2014

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María Teresa Certucha Barragán  
Secretario

21 de Noviembre de 2014

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Onofre Monge Amaya  
Vocal

21 de Noviembre de 2014

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Aarón de Jesús Rosas Durazo  
Sinodal Externo

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

Diciembre 12, de 2014.

Por la presente se hace constar que la estudiante **ALVARO SANTOS ROMO**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del programa de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química.



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

**DR. FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA**  
**COORDINADOR**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA:**  
**INGENIERIA QUIMICA**

**POSGRADO EN**  
**CIENCIAS DE**  
**LA INGENIERÍA:**  
**INGENIERÍA QUÍMICA**

## RESUMEN

Los microorganismos dispersados por el aire tienen gran importancia biológica y económica, producen enfermedades en plantas, animales y humanos debido a que pueden ser transportados rápidamente, en forma de bioaerosoles causando alteraciones en alimentos y materiales orgánicos, además de contribuir al deterioro y corrosión del metal de monumentos y edificios. Varias enfermedades víricas, bacterianas y fúngicas del hombre y los animales son transmitidas por el aire y a menudo producen brotes epidémicos. En el presente trabajo se busca identificar el contenido de bacterias de importancia clínica asociadas a partículas finas PM<sub>10</sub> y PST que pudieran estar relacionadas con las enfermedades respiratorias de mayor incidencia en la Ciudad de Hermosillo. Se analizaron tres Periodos de un mes (Febrero, Mayo y Agosto-Septiembre) durante un año (2011), en cuatro sitios de muestreo en la ciudad (En el Norte en la Universidad Estatal de Sonora, Centro en el edificio de Inspección y Vigilancia del Ayuntamiento, Sur en el COBACH Villa de Seris y Noroeste en el CBTIS 206). Las partículas PM<sub>10</sub> y PST retenidas en los filtros de los muestreadores de partículas de alto volumen se analizaron para identificar el contenido microbiológico por medio de métodos convencionales y técnicas de Biología Molecular, así como estudios de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de Energía de Dispersión de Rayos X (EDS) para su análisis físico y químico. En los estudios de MEB se muestra la presencia de microorganismos asociados a las partículas, en el análisis de EDS de las PM<sub>10</sub> se identificaron los siguientes elementos Mg, Al, P, S, Cl, K, Ca, Fe y Sr; mientras que en las PST, C, Mg, Al, S, Cl, Ca, Fe y Ti; de los cuales, puede alguno estar ocasionando problemas de salud en la población. Con ayuda del software Piximetre y SigmaPlot se realizó distribución de tamaño de partículas cuyo resultado muestra que aproximadamente el 65 % corresponde a partículas menores de 2.5 µm. Mediante métodos convencionales de identificación microbiana se evidenció la presencia de *E. faecalis*, *Klebsiella pneumoniae subpneumoniae* y *Citrobacter sp10* principalmente, así como *Pseudomonas* y *Enterobacterias*. El contenido microbiológico asociado a las PM<sub>10</sub> y PST también se analizó por técnicas de Biología Molecular, específicamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se aplicó el protocolo del Gene Clean para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) directamente de los filtros de PM<sub>10</sub> y PST con resultados satisfactorios. Se tomaron pequeñas porciones de los filtros obtenidos de los muestreadores de partículas, logrando extraer el ADN de los posibles microorganismos, obteniendo así

valores en un intervalo de 2.53 a 30.63 ng/ $\mu$ L. Estos valores de concentración de ADN permitieron lograr una amplificación satisfactoria y tener éxito en la identificación de microorganismos mediante el PCR. Se aplicó el protocolo de IQ SYBR GREEN SUPER MIX y “primers” específicos para la identificación y amplificación de *E. faecalis*. Fueron utilizadas muestras con una cepa de *E. faecalis* como control positivo para la estandarización de la técnica. Se realizó un análisis de especificidad donde se incluyeron muestras de ADN de *Staphylococcus áereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y como control positivo *E. faecalis* obteniéndose una alta especificidad. Se desarrolló un estudio de sensibilidad de la técnica donde se llevaron a cabo diluciones seriadas en donde a partir de 15 bacterias/ $\mu$ L se logró amplificar su ADN. Se realizó PCR de muestras de filtros con PM<sub>10</sub> y PST obteniéndose resultados positivos para *E. faecalis* en las cuatro estaciones, en la Sur 50%, en la Centro 66 %, en la Norte 75 % y 66 % en la Noroeste, de las muestras analizadas. Las técnicas tradicionales de identificación basadas en el cultivo y las características fenotípicas de las bacterias resultaron ser laboriosas en comparación con las técnicas modernas de biología molecular. Los resultados indican que es posible el uso de la biología molecular en la identificación de microorganismos presentes en las partículas atmosféricas capturadas en los filtros de muestreadores de aire de alto volumen.

## ABSTRACT

Microorganisms dispersed by air have great biological and economic importance, cause diseases in plants, animals and humans because they can be transported quickly as bioaerosols causing alterations in food and organic materials, and contribute to the deterioration and corrosion of metal monuments and buildings. Several viral, bacterial and fungal diseases of man and animals are transmitted by air and often outbreaks occur. In the present work is to identify the content of clinically important bacteria associated with fine particles PM<sub>10</sub> and TSP that may be related to the higher incidence of respiratory diseases in the city of Hermosillo. Three periods of one month (February, May and August-September) were analyzed for one year (2011), in four sampling sites in the City (In North in Universidad Estatal de Sonora, Center in the building of Inspection and Supervision city hall, South in COBACH Villa de Seris and Northwest in CBTIS 206). The PM<sub>10</sub> and TSP particles retained in the filters of high volume samplers of particles were analyzed to identify the microbiological content by traditional methods and molecular biology techniques, as well as studies of Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Spectroscopy Dispersive X-ray (EDS) for physical and chemical analysis. In SEM studies shown the presence of microorganisms. The elements Mg, Al, P, S, Cl, K, Ca, Fe and Sr in PM<sub>10</sub> and C, Mg, Al, S, Cl, Ca, Fe and Ti in STP were identified in EDS analysis, of which may be causing any health problems in the population. Using the software SigmaPlot and Piximetre, particle size distribution was performed, whose result shows that approximately 65 % corresponds to particles smaller than 2.5 microns. By conventional methods, *E. faecalis*, *Klebsiella pneumoniae subpneumoniae* and *Citrobacter sp10* mainly, as well as *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* were evidenced. Microbiological content associated to TSP and PM<sub>10</sub> was also analyzed by molecular biology techniques, specifically by Polymerase chain reaction (PCR). Clean Gene protocol for extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) directly of PM<sub>10</sub> and TSP filters was applied with satisfactory results. Small portions of the filters obtained of particles samplers were taken, achieving extract DNA from the possible microorganisms, obtaining values in the range 2.53 to 30.63 ng/μL. These concentration values of DNA allow achieve satisfactory amplification and success in identification of microorganisms by PCR. The IQ SYBR Green SUPER MIX protocol and specific "primers" for identification and amplification of *E. faecalis* was applied. Samples with *E. faecalis* as a positive control for the standardization of the

technique were used. Specificity analysis was performed with DNA samples from *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomona aeruginosa* and *E. faecalis* as a positive control obtaining high specificity. Sensitivity study of the technique was developed which serial dilutions were carried out and where DNA concentrations from 15 bacteria/ $\mu\text{L}$  were amplified. PCR was performed on filter samples with  $\text{PM}_{10}$  and TSP with positive results for *E. faecalis* in the four sampling stations, 50% at South, 66% at Centre, 75% at North and 66% in the Northwest station, of samples analyzed. The traditional identification techniques based on culture and phenotypic characteristics of bacteria proved to be laborious compared to modern techniques of molecular biology. The results indicate that it is possible to use molecular biology in the identification of microorganisms present in atmospheric particles caught in the filters of high volume air samplers.



---

## DEDICATORIA

A MIS PADRES POR SU AMOR, TRABAJO Y SACRIFICIOS PARA AYUDARME A CONVERTIRME EN LO QUE SOY. A MI PADRE QUE ESTOY SEGURO QUE ESTARÁ MUY FELÍZ DE VERME CON UN LOGRO MÁS EN MI VIDA... DESDE EL CIELO.

A MI ESPOSA, QUE SIEMPRE HA ESTADO A MI LADO, POR SU CARIÑO, PACIENCIA Y COMPRENSIÓN. POR LOS MOMENTOS FELICES QUE HEMOS PASADO JUNTOS, POR LOS MOMENTOS AMARGOS QUE HEMOS SUPERADOS Y QUE HA SIDO PIEZA CLAVE EN ELLO. POR SU APOYO INCONDICIONAL PARA CULMINAR ESTE LOGRO ACEDÉMICO TAN IMPORTANTE PARA MÍ.

A MIS HIJOS ESTEPHANIE ANAID, SAYRA GUADALUPE Y LUIS ALVARO, POR SER LA FUERZA QUE ME IMPULSA EN EL DÍA A DÍA A MIRAR HACIA ADELANTE, POR SER LA FUENTE DE INSPIRACIÓN QUE ME MUEVE A BUSCAR Y OFRECERLES LO MEJOR.

A LA PEQUEÑA ROMMY, UNA ETAPA NUEVA EN NUESTRAS VIDAS.

---

## AGRADECIMIENTO

Agradezco, primero DIOS, a todas las personas, familiares, amigos y compañeros, que directa e indirectamente contribuyeron a que a que este proyecto de tesis se concretara satisfactoriamente.

A mi comité de tesis, al Dr. Fco. Javier Armendáriz Tapia, a la Dra. María Teresa Certucha Barragán, a la Dra. Onofre Monge Amaya, al Dr. Aarón de Jesús Rosas Durazo y al Dr. Jorge Hernández López por todo el apoyo brindado durante el desarrollo del programa de doctorado, por compartirme sus conocimientos y experiencia profesional, por ayudarme y alentarme en cada una de las fases del programa y sobre todo por estar todos pendientes de que este trabajo culminara exitosamente.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC., que me brindó la oportunidad y las facilidades necesarias para lograr esta superación académica.

A la Universidad de Sonora, al Programa de Posgrado en Ciencias de la Ingeniería y a todos los Doctores que forman parte de la excelente plantilla docente, por aceptarme en el Programa de Posgrado y por transmitirme sus valiosos conocimientos.

Al CONACYT, por al apoyo económico otorgado para que fuera posible el desarrollo y consecución de este programa.

Al Instituto Municipal de Ecología, en particular al Ingeniero Joel Zepeda Ibarra, por su valiosa colaboración en la aportación de los materiales para llevar a cabo esta investigación.

Al Laboratorio de Microscopia Electrónica del CIBNOR La Paz, en especial al Técnico Ariel Arturo Cruz Villacorta por su valiosa participación en este proyecto mediante la dirección y capacitación en el análisis de las muestras a través de la microscopia electrónica de barrido.

A la compañera Nancy Sau Acosta por su apoyo en los análisis de bacteriología, así como a Rocío y Noemí.

---

A todos los compañeros del CIBNOR que de alguna manera ayudaron a que este proyecto tuviera éxito, a los compañeros del Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola, a los Biólogos Trinidad Encinas, Daniel Coronado y MC. Fernando Mendoza, que con sus apoyos y recomendaciones colaboraron a que esta investigación tuviera éxito, al Ing. Juan Vega del área de Ingeniería, quien siempre me ayudó y cubrió mi puesto de trabajo mientras me encontraba cumpliendo con los compromisos de la Universidad. A todos ellos un especial agradecimiento. A los Doctores del CIBNOR la Paz que en su momento nos alentaron y dieron la oportunidad y facilidad para que nos mantuviéramos siempre con el objetivo presente de continuar trabajando en el rubro de la Superación Académica, al Dr. Ricardo Rodríguez Estrella y al Dr. Alfonso Maeda Martínez.

Un reconocimiento y agradecimiento particular al Dr. Jorge Hernández por su especial apoyo, porque siempre me ha alentado, guiado y apoyado en este rubro tan importante de la superación académica.

Especial y obligado agradecimiento a la Dra. Certucha por todo el apoyo brindado, por su desinteresado tiempo invertido y conocimientos aportados para que todos los compromisos demandados por el programa de Posgrado se cumplieran en tiempo y forma.

A todos ellos y a todos los que involuntariamente por descuido no menciono, les doy las gracias.

---

---

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT .....	VI
DEDICATORIA.....	VIII
AGRADECIMIENTO .....	IX
TABLA DE CONTENIDOS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE TABLAS .....	XVIII
CAPÍTULO I .....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	1
1.1 Introducción .....	1
1.2 Justificación .....	4
1.3 Objetivo General .....	4
1.4 Objetivos Específicos .....	4
CAPÍTULO II.....	5

<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....</b>	<b>5</b>
2.1 Calidad del Aire .....	5
2.2 Caracterización de Partículas .....	6
2.3 Métodos de Muestreo de Partículas .....	9
2.3.1 Equipos de medición de partículas en suspensión por filtración de alto volumen. ....	9
2.3.2 Captadores de partículas de bajo volumen.....	10
2.4 Muestreadores de Partículas para Microbiología .....	11
2.5 Métodos de Identificación de Microorganismos .....	12
2.6 Infecciones Respiratorias en la Ciudad de Hermosillo .....	15
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>17</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1. Área de Estudio .....	18
3.2 Muestreo .....	19
3.3 Caracterización de Partículas .....	21
3.3.1 Concentración de partículas PM <sub>10</sub> y PST .....	21
3.3.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	24
3.3.3 Espectroscopia de energía de dispersión de rayos X. ....	25
3.3.4 Distribución del tamaño de partículas de PM <sub>10</sub> y PST. ....	25
3.4 Análisis Microbiológico por Pruebas Bioquímicas .....	26
3.4.1 Toma de muestras.....	26
3.4.2 Análisis microbiológico.....	27
3.5 Análisis Microbiológico por Biología Molecular.....	29
3.5.1. Estandarización de la técnica .....	29
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>37</b>

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Caracterización de Partículas .....</b>	<b>37</b>
4.1.1 Concentración de partículas PM <sub>10</sub> y PST .....	37
4.1.2 Microscopía de barrido electrónico .....	38
4.1.3 Espectroscopia de energía de dispersión de rayos X. ....	42
4.1.4 Distribución del tamaño de partículas de PM <sub>10</sub> y PST. ....	49
<b>4.2 Análisis Microbiológico por Pruebas Bioquímicas .....</b>	<b>55</b>
4.2.1 Toma de muestras.....	55
4.2.2 Análisis microbiológico.....	56
<b>4.3 Análisis Microbiológico por Biología Molecular.....</b>	<b>60</b>
4.3.1 Estandarización de la técnica .....	60
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>78</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>82</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>87</b>
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) .....	87
<b>ANEXO B.....</b>	<b>94</b>
Muestreadores de Partículas para Microbiología.....	94
<b>ANEXO C.....</b>	<b>98</b>
Protocolo de extracción de ADN (Gene clean) .....	98

---

<b>ANEXO D .....</b>	<b>102</b>
<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa. ....</b>	<b>102</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Figura 2.1.</b> Equipos manuales de muestreo de partículas en suspensión, totales y menores a diez micrones de diámetro aerodinámico, por filtración de alto volumen de aire, disponibles en el mercado. ....	10
<b>Figura 2.2.</b> Equipos automáticos de muestreo de partículas en suspensión, PM <sub>10</sub> y PM <sub>2.5</sub> por filtración de bajo volumen de aire, disponibles en el mercado. ....	11
<b>Figura 2.3.</b> Número de IRA's en la ciudad de Hermosillo Sonora, México durante el Periodo 2006-2010. ....	16
Fuente: Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES). ....	16
<b>Figura 3.1.</b> Diagrama general. ....	17
<b>Figura 3.2.</b> Mapa de la ciudad de Hermosillo donde se muestran las ubicaciones de las estaciones de muestreo. ....	20
<b>Figura 3.3</b> Arreglos de las muestras para su manejo en el microscopio. ....	25
<b>Figura 3.4.</b> Algoritmo de identificación de microorganismos. ....	28
<b>Figura 3.5.</b> Diagrama que muestra el procedimiento para determinar la sensibilidad de la técnica para identificar <i>E. faecalis</i> por PCR tiempo real. ....	36
<b>Figura 4.1.</b> Concentración de PM <sub>10</sub> a) Primer muestreo, b) Segundo muestreo, c) Tercer muestreo y PST d) Primer muestreo, e) Segundo muestreo, f) Tercer muestreo; en los diferentes sitios. ....	39
<b>Figura 4.2 a) y b)</b> Micrografías de filtro blanco virgen a 50 y 10 µm, respectivamente. ....	40
<b>Figuras 4.3 a), b), c), d), e) y f)</b> Micrografías de filtros con partículas PM <sub>10</sub> a diversos aumentos del microscopio. ....	41
<b>Figura 4.4 a) y b)</b> Micrografías de filtro blanco virgen a 50 y 10 µm, respectivamente. ....	41
<b>Figuras 4.5 a), b), c), d), e) y f)</b> Micrografías de filtro con partículas PST a diversos aumentos del microscopio. ....	42
<b>Figura 4.6</b> Concentración de elementos químicos en la estación Sur. ....	44
<b>Figura 4.7</b> Concentración de elementos químicos en la estación Norte. ....	45
<b>Figura 4.8</b> Concentración de elementos químicos en la estación Noroeste. ....	46
<b>Figura 4.9</b> Concentración de elementos químicos en la estación Centro. ....	47



<b>Figura 4.10</b> Concentración de elementos químicos en la estación Centro. ....	48
<b>Figura 4.11</b> Distribución de tamaño de partículas PM <sub>10</sub> de la Estación Sur, a) Periodo 1, b) Periodo 2 y c) Periodo 3. ....	50
<b>Figura 4.12</b> Distribución de tamaño de partículas PM <sub>10</sub> de la estación Norte, a) Periodo 1, b) Periodo 2 y c) Periodo 3. ....	51
<b>Figura 4.13</b> Distribución de tamaño de partículas PM <sub>10</sub> de la Estación Noroeste, a) Periodo 1, b) Periodo 2 y c) Periodo 3. ....	53
<b>Figura 4.14</b> Distribución de tamaño de partículas PST de la Estación Centro, a) Periodo 1, b) Periodo 2 y c) Periodo 3. ....	54
<b>Figura 4.15</b> UFC de bacterias mesófitas obtenidas en cada estación de muestreo en tres diferentes épocas del año (a). Distribución por zona muestreada (b). ....	58
<b>Figura 4.16.</b> Promedio de concentraciones (ng/μL) de ADN de las muestras que corresponden al primer período de muestreo. ....	61
<b>Figura 4.17.</b> Promedio de concentraciones (ng/μL) de ADN de las muestras que corresponden al segundo período de muestreo. ....	62
<b>Figura 4.18.</b> Promedio de concentraciones (ng/μL) de ADN de las muestras que corresponden al tercer período de muestreo. ....	62
<b>Figura 4.19.</b> Gráfica de melt de PCR con 52 °C en la amplificación. ....	66
<b>Figura 4.20.</b> Gráfica de melt de PCR con 54 °C en la amplificación. ....	67
<b>Figura 4.21.</b> Gráfica de melt de PCR con 56 °C en la amplificación. ....	67
<b>Figura 4.22.</b> Gráfica de melt de PCR con 58 °C en la amplificación. ....	68
<b>Figura 4.23.</b> Gráfica de melt de PCR con 60 °C en la amplificación. ....	68
<b>Figura 4.24.</b> Gráfica de melt de PCR con 62 °C en la amplificación. ....	69
<b>Figura 4.25.</b> Gráfica de curva de amplificación de M1 y M2 con 1, 2 y 3 μL de ADN en la reacción. ....	70
<b>Figura 4.26.</b> Gráfica de curva de amplificación de diferentes cepas. ....	71
<b>Figura 4.27.</b> Gráfica de curva de melt de diferentes cepas. ....	71
<b>Figura 4.28.</b> Gráfica de curvas de amplificación de las diluciones. ....	73
<b>Figura 4.29.</b> Gráfica de curvas melt de las diluciones. ....	74
<b>Figura 4.30.</b> Gráfica de curvas de amplificación de muestras de filtros con partículas atmosféricas. ....	75
<b>Figura 4.31.</b> Gráfica de porcentajes de muestras positivas a <i>E. faecalis</i> por Periodo y sitio de muestreo. ....	76
<b>Figura 4.32.</b> Gráfica de porcentajes de muestras positivas a <i>E. faecalis</i> por sitio de muestreo. ....	76
<b>Figura 7.1.</b> Estación de microscopio electrónico de barrido. ....	89

---

<b>Figura 7.2.</b> Metalizador Dentom Vacuum Desk II.....	92
<b>Figura 7.3.</b> Sistema de microanálisis.....	92
<b>Figura 7.4.</b> Muestreadores de cascada Andersen de dos y seis etapas .....	95
<b>Figura 7.5.</b> Muestreadores en fase líquida con fraccionamiento de tamaño. ....	97
<b>Figura 7.6.</b> Diagrama del protocolo de cuantificación de ADN. ....	101
<b>Figura 7.7.</b> Proceso de replicación del ADN a nivel celular. Horquilla de replicación del ADN con algunas de las proteínas más importantes que participan en el proceso. La molécula original de ADN sirve de molde para que la ADN polimerasa genere una nueva copia de un fragmento de ADN. La ADN polimerasa celular requiere la presencia de un iniciador para llevar a cabo el proceso de replicación.....	102

---

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 3.1. Primers para identificación de <i>E. faecalis</i> . .....	31
Tabla 3.2. Protocolo de amplificación de ADN de muestras de filtros para identificar <i>E. faecali</i> .....	34
Tabla 4.1. Periodos de muestreo .....	43
Tabla 4.2. Microorganismos identificados usando pruebas bioquímicas. ....	57
Tabla 4.3 Prueba de sensibilidad a los antibióticos de 6 cepas de <i>E. faecalis</i> . ....	59
Tabla 4.4. Concentración de bacterias en cada una de las diluciones empleadas.....	72
Tabla 4.5. Número de filtro en cada uno de los Periodos y estaciones de muestreo.....	75
Tabla 7.1. Concentración de elementos químicos en PM <sub>10</sub> . ....	93
Tabla 7.2. Concentración de elementos químicos en PST. ....	94
Tabla 7.3. Copias de ADN generadas por la PCR en cada ciclo. ....	104

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1 Introducción

La contaminación atmosférica es la adición de cualquier sustancia que altere las propiedades físicas o químicas del aire. La contaminación del aire se puede definir como la presencia en la atmósfera exterior de uno o más contaminantes o sus combinaciones, en cantidades tales y con tal duración que puedan afectar la vida humana, de animales, de plantas, o de la propiedad, que interfiera el goce de la vida, la propiedad o el ejercicio de las actividades. Un aire puro es considerado como una mezcla gaseosa compuesta de nitrógeno, oxígeno y argón junto con otros gases, con porcentajes aproximados del 78, 21 y 1 %, respectivamente. Esta es la composición química del aire seco, que se encuentra usualmente en las áreas rurales y sobre el océano, lejos de los asentamientos humanos (Sbarato y col., 2000; Wark, 2004).

Durante los últimos años, se han publicado múltiples estudios epidemiológicos y toxicológicos relacionados con la presencia en el aire de material particulado y algunos gases contaminantes. Tales estudios demuestran asociación entre la exposición a gases y partículas muy finas y la exacerbación de los síntomas de pacientes con enfermedades respiratorias como asma y rinitis. Diariamente los seres humanos estamos expuestos a estas sustancias, muchas de ellas necesarias para procesos biológicos de nuestro cuerpo; sin embargo, la exposición a concentraciones altas tiene un efecto dañino especialmente en el sistema respiratorio (Sánchez, 2012).

En la mayoría de las ciudades, la calidad del aire se deteriora cada día más afectando la salud de la población. Uno de los contaminantes que afectan seriamente la salud de la población son las partículas atmosféricas, cuya exposición a la salud poblacional ha sido ampliamente estudiada y asociada con incrementos en la morbilidad y mortalidad (Rojano y col., 2013; Akhtar, 2014). En la atmósfera permanecen suspendidas sustancias como partículas de polvo, polen, carbón, metales como plomo y cadmio, asbesto, sales, pequeñas gotas de ácido sulfúrico, dioxinas, pesticidas, etc., (Sepulveda, 2004).

Estas partículas atmosféricas son capaces de bloquear los mecanismos de defensa del aparato respiratorio, a nivel de vías aéreas superiores y alvéolos, además de que pueden acarrear elementos biológicos que van desde pólenes hasta bacterias, hongos y virus que son transportados al pulmón. Las partículas que miden más de 10 micrómetros se retienen básicamente en las vías respiratorias superiores. Las que miden menos predominan en la fracción respirable y son las de mayor interés, ya que penetran hasta el espacio alveolar del pulmón y pueden ingresar también en el torrente sanguíneo (Ssa, 1993; Akhtar, 2014). La inhalación de partículas de polvo puede reducir la función de los pulmones e inducir el desarrollo de síntomas alérgicos e inmunotóxicos (Awad, 2007; Leung, 2014).

El término “partícula” se utiliza para describir cualquier material sólido o líquido dispersado o arrastrado por el aire y que tiene una variación de tamaño entre 0.0002 y 500  $\mu\text{m}$ . También se utiliza indistintamente el término “aerosol” ya que estos se definen como dispersiones de sólidos o líquidos en un medio gaseoso (Rojano y col., 2013). La composición química de las partículas es variada y depende de la fuente productora. El carbono elemental que forma su núcleo resulta de la combustión incompleta de derivados fósiles (gasolina, diésel, petróleo), madera o biomasa (Sánchez, 2012). El material particulado aerotransportado está compuesto de partículas sólidas y líquidas, así como de suspendidas y dispersas. Debido a que son de diferente tamaño y forma, se han clasificado en términos de diámetro aerodinámico, las cuales se agrupan en finas y gruesas. Las partículas finas son las de diámetro aerodinámico menor o igual a 2,5  $\mu\text{m}$ ,  $\text{PM}_{2.5}$ . Otro grupo de partículas está constituido por aquellas cuyo diámetro aerodinámico se centra alrededor de las 10 micras,  $\text{PM}_{10}$  (Pérez y col., 2010). Dentro de la clasificación de las partículas tenemos el material de partículas suspendidas, que se refiere a todas las partículas rodeadas por aire, en un determinado volumen de aire no perturbado. Las Partículas Totales en Suspensión (TSP, por sus siglas en inglés). En el rango de partículas finas se encuentran los aerosoles primarios del carbón, y aerosoles secundarios resultado de transformaciones químicas seguidas por procesos de condensación. Las partículas gruesas ( $\text{PM}_{10}$ ) resultan principalmente de procesos mecánicos como la resuspensión, abrasión o fricción, son predominantemente de origen natural o geológico. Pueden ser por ejemplo esporas, polen, suelos, partículas de hojas, polvos generados por el tráfico o producto del desgaste de las plantas y partículas de emisiones industriales. En la superficie de estas partículas pueden adsorberse otras especies contaminantes (Sbarato y col., 2000). La composición química de las partículas, así como su tamaño y morfología o área superficial, son los principales factores que determinan el riesgo a la salud de la población, de ahí la importancia de llevar a cabo su caracterización física química, así como su distribución de tamaño.

La incidencia de las alergias, las enfermedades alérgicas y el asma están aumentando en todo el mundo (Menetrez y col.,2009). La atmósfera no tiene una microbiota autóctona pero es un medio para la dispersión de muchos tipos de microorganismos (esporas, bacterias, virus y hongos), procedentes de otros ambientes. Los microorganismos dispersados por el aire tienen gran importancia biológica y económica, producen enfermedades en plantas, animales y humanos debido a que pueden ser transportados rápidamente, en forma de bioaerosoles causando alteraciones en alimentos y materiales orgánicos y contribuyen al deterioro y corrosión del metal en monumentos y edificios (De la Rosa y col., 2002; Awad, 2007). Varias enfermedades víricas, bacterianas y fúngicas del hombre y los animales son transmitidas por el aire y a menudo producen brotes epidémicos. Estas enfermedades pueden clasificarse en respiratorias (neumonía, tosferina, tuberculosis, legionelosis, resfriado, gripe), en sistémicas (meningitis, sarampión, varicela, micosis) y alérgicas (De la Rosa y col., 2002). Estudios de monitoreo de las partículas atmosféricas y la caracterización del contenido de aerosoles biológicos no se han realizado extensivamente (Menetrez y col. 2009). Las Infecciones Respiratorias Agudas no son producidas por la partícula inerte, sino por un microorganismo que se encuentra asociado a la misma, por lo que es importante la caracterización biológica del material particulado  $PM_{10}$  y PST.

Las técnicas tradicionales de identificación basadas en el cultivo y las características fenotípicas de las bacterias son laboriosas y pueden requerir varias semanas para obtener resultados, lo cual no resulta viable cuando se requiere aplicar un tratamiento médico a un paciente con un cuadro bacteriológico en estado crítico. Técnicas avanzadas de diagnóstico mediante la biología molecular, han venido a atenuar significativamente la obtención de resultados en tiempos reducidos y con mayor precisión. Una de estas técnicas es la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Cornejo y col., 2014).

En este trabajo se realizó la caracterización física química de las partículas con la finalidad de conocer su composición química, morfología y tamaño. Por otra parte se caracterizó la microflora existente en el aire mediante técnicas convencionales de identificación y se estandarizó la técnica de PCR para identificar bacterias asociadas a las partículas atmosféricas en filtros que capturan el material particulado de diámetro igual o menor a  $PM_{10}$  y PST utilizando muestreadores de partículas de alto volumen.

## 1.2 Justificación

La contaminación atmosférica se define como la presencia en el aire de materias inertes, químico o biológico, que impliquen riesgo, daño o molestia grave para las personas, así como que puedan atacar a distintos materiales, reducir la visibilidad o producir olores desagradables. En la mayoría de los trabajos sobre contaminación atmosférica se analiza el aire desde el punto de vista químico y gravimétrico. Sin embargo, la parte biológica ha sido poco estudiada. En varios lugares de México se ha analizado la calidad del aire pero, hasta el momento, no se tienen registros del análisis de componentes biológicos que puedan causar enfermedad en los humanos y/o animales domésticos. Se sabe que en Hermosillo, los niveles de polvo en el aire son altos debido a las emisiones de vehículos e industria, además de que varias áreas no cuentan con pavimentación lo que aumenta la suspensión de partículas de polvo en el ambiente. Los registros de las instituciones de salud en Hermosillo indican un alto porcentaje de infecciones respiratorias Agudas (IRAs), las cuales pueden ser causadas por organismos que se transmiten por el aire. Debido a esto y a la falta de conocimiento sobre la presencia de bacterias, hongos, parásitos o virus en el aire, es necesario analizar las partículas del aire con el fin de detectar la presencia de estos agentes patógenos que puedan ser dispersados por el aire. En este trabajo se pretende analizar la calidad química del aire y buscar la presencia de bacterias potencialmente patógenas para la población o los animales domésticos.

## 1.3 Objetivo General

Analizar espacial y temporalmente el contenido microbiológico de las partículas atmosféricas de la Ciudad de Hermosillo, Sonora.

## 1.4 Objetivos Específicos

- Caracterizar física y químicamente las partículas atmosféricas.
- Analizar el contenido microbiológico de las partículas atmosféricas en tres Periodos del año y en cuatro sitios de muestreo por técnicas bioquímicas.
- Estandarizar y evaluar la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para identificar bacterias asociadas a partículas atmosféricas.

## CAPÍTULO II

### ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

#### 2.1 Calidad del Aire

Estudios e investigaciones recientes demuestran que las partículas que causan problemas significativos de contaminación del aire y efectos a la salud, son las de tamaños menores a 10  $\mu\text{m}$ , conocidas como  $\text{PM}_{10}$ . Las  $\text{PM}_{10}$  (con diámetros aerodinámicos aproximadamente, siete veces menores que el grosor de un cabello humano), pueden viajar a lo más profundo del sistema respiratorio y depositarse en los alvéolos pulmonares, quedando atrapados en las membranas.

Actualmente en México, las  $\text{PM}_{10}$  se consideran contaminantes criterio (estándar de calidad del aire que se debe cumplir para asegurar la salud pública) y la norma que se debe cumplir no debe rebasar los 120  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  como promedio de 24 horas. En los últimos años ha crecido la preocupación por las partículas menores a 2.5  $\mu\text{m}$ , también conocidas como  $\text{PM}_{2.5}$ , debido a su alta peligrosidad para la salud humana. En nuestro país se estima que 38 mil personas murieron entre 2001 y 2005 a causa de la contaminación atmosférica; de estas, aproximadamente 5000 fueron niños. Estas cifras representan más del doble de las muertes atribuidas a las enfermedades diarreicas ocasionadas por el consumo de agua no potable y por la falta de medidas sanitarias. La mortalidad debida a la contaminación atmosférica ocurre más frecuentemente en las zonas urbanas, pues cerca del 63 % de los casos ocurrieron en las zonas metropolitanas del valle de México, Guadalajara, Monterrey, Puebla y Toluca. En términos monetarios, las cifras más recientes del INEGI arrojan que la contaminación atmosférica representó los mayores costos ambientales en 2009, al ubicarse en 520 mil millones de pesos, equivalente al 4.4 % del producto interno bruto.

Este problema está generalizado a escala mundial. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, 1.5 millones de personas murieron en 2004 debido a cáncer de pulmón, enfermedades cardiopulmonares e infecciones respiratorias relacionadas con la exposición a la contaminación



atmosférica en zonas urbanas. En los países de ingresos medios y bajos del continente americano, como México, el 2% de todas las muertes registradas en 2004 se relacionó con la contaminación atmosférica, particularmente con la exposición a partículas suspendidas ( $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$ ). Esta proporción es diez veces mayor que la mortalidad asociada con el cambio climático global (Ine-Semarnat, 2009).

Las principales fuentes de partículas son básicamente los procesos de combustión que se utilizan en vehículos; procesos industriales tales como las plantas generadoras de energía, los incineradores, actividades de la construcción, los incendios y las erosión del suelo.

Muchos estudios muestran la relación entre las concentraciones ambientales de partículas y los efectos en la salud. El incremento en las partículas está altamente correlacionado con el ingreso hospitalario por enfermedades relacionadas con el sistema respiratorio, tales como: deficiencia pulmonar, incremento de problemas respiratorios y muerte prematura. Las partículas afectan de manera directa los pulmones y las vías respiratorias.

La contaminación del aire proviene de una mezcla de miles de fuentes de emisión que van desde chimeneas industriales y vehículos automotores hasta el uso de productos de limpieza y pinturas domésticos. Incluso la vida animal y vegetal puede desempeñar un papel importante en la contaminación del aire. En general, para los propósitos de un inventario de emisiones, las fuentes de emisión se agrupan en cuatro categorías principales: fuentes puntuales o fijas, fuentes de área, fuentes móviles (de vehículos automotores) y fuentes naturales (Ine-Semarnat, 2009).

## 2.2 Caracterización de Partículas

Un análisis completo de las partículas atmosféricas consiste de tres etapas: La cuantificación de la masa, la caracterización de la distribución por tamaño de las partículas y el análisis físico y químico de las fracciones particuladas.

Leung y col. (2014) llevaron a cabo un estudio para realizar una caracterización física y química de material particulado de  $2.5 \mu m$  en cinco ciudades en China. El análisis se llevó a cabo para el Periodo de invierno del 2012 donde se analizaron 15 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en muestras de  $PM_{2.5}$  mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. Los efectos biológicos de extractos orgánicos fueron evaluados utilizando las células epiteliales bronquiales humanas BEAS-2B.

Las muestras de partículas  $PM_{2.5}$  se recogieron en filtro de fibra de cuarzo (8 pulgadas x 10 pulgadas) usando muestreadores de alto volumen con una velocidad de flujo de 1.05 a 1.16  $m^3/min$ . Las mediciones de los HAPs se realizaron como lo describe el método estándar 3540C. Diez HAPs prioritarios fueron identificados en las muestras de PM en las cinco ciudades; mientras que todos los 15 HAPs pudieron ser detectados en muestras de Xi'an y Beijing. Los resultados de los análisis químicos mostraron los mayores niveles de contaminación de HAPs en Xi'an y Beijing, lo que indica que la contaminación en estas dos ciudades es mucho más grave que la de Hong Kong, Guangzhou y Xiamen. Se utilizaron factores de equivalencia tóxica para evaluar la posibilidad de los riesgos de cáncer en el carcinógeno humano benzo-a-pireno. El análisis sugiere que una exposición a largo plazo a tal ambiente puede causar efectos adversos a la salud, tales como un mayor riesgo de contraer cáncer de pulmón. También sugiere que nuevas medidas de política sobre emisiones de  $PM_{2.5}$  deben adoptarse para proteger la calidad del aire y el deterioro de la salud pública contra la contaminación del aire, especialmente en las ciudades del Norte de China (Leung y col., 2014).

Minguillón y col. (2014) realizaron un estudio para determinar la concentración de masa, la composición y las fuentes del material particulado fino y grueso en Tijuana, México durante el proyecto Cal-Mex, el cual se centra en una investigación de la atmósfera a lo largo de la región fronteriza México-California. El muestreo se llevó a cabo en dos sitios ubicados en el área urbana de Tijuana: Parque Morelos y Metales y Derivados. Se colectaron muestras de  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  cada tres días durante el Periodo del 17 de mayo al 27 de Junio del 2010, estas muestras se utilizaron para los análisis gravimétricos y químicos (elementos mayores y menores, iones inorgánicos, carbono orgánico y elemental) del material particulado. Se utilizaron filtros de cuarzo en muestreadores de alto volumen y la concentración se determinó gravimétricamente. Las concentraciones promedio de  $PM_{2.5}$  y  $PM_{10}$  durante el Periodo de muestreo fueron relativamente menores en comparación con los promedios anuales habituales. Las muestras fueron analizadas por Espectroscopia de Emisión Atómica de plasma inductivamente acoplado (ICP-AES) y Espectrometría de Masas de plasma inductivamente acoplado (ICP-MS). Las concentraciones de elementos traza registrados en el estudio fueron inferiores a los registrados en la Ciudad de México en 2006, con la excepción de Pb en Metales y Derivados, lo cual se atribuye a la influencia de una fuente industrial específica, que también incluye As, Cd y Ti. Aparte de esta fuente industrial, se encontraron ambos sitios afectados por fuentes similares con respecto a la masa del material particulado. La aportación de partículas finas ( $PM_{2.5}$ ) fue atribuida principalmente a la combustión de gasolina y biomasa, aerosoles secundarios y tráfico por carretera. La aportación de las partículas gruesas ( $PM_{10}$ ) se adjudicó

principalmente a fuentes minerales (resuspensión de polvo de carretera, emisiones de la construcción y suelo natural) y sal de mar. El tráfico de carretera fue responsable de más del 60% del carbono elemental fino y casi el 40% de la materia orgánica fina (Minguillón y col., 2014).

Cruz y col. (2013) realizaron una evaluación de la calidad del aire en la ciudad de Hermosillo con respecto de PST y metales pesados (Pb, Cd, Ni, Cu, Cr) durante el período Junio de 2001 a mayo de 2002, en tres estaciones de monitoreo. El muestreo se realizó utilizando el método de alto volumen estableciéndose muestreos cada 6 días no simultáneos en los tres sitios. Para la determinación de metales pesados, los filtros fueron analizados por espectroscopia de absorción atómica. Los resultados de este estudio indican que las concentraciones de PST en las estaciones Centro y Noroeste rebasaron frecuentemente el máximo permisible para 24 h ( $260 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), mientras que en los tres sitios de monitoreo fue rebasado el máximo permisible anual ( $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) ambos establecidos en la Norma NOM-024-SSA1-1993 (SSA, 1994a), lo cual indica que la calidad del aire en la ciudad de Hermosillo con respecto de PST se encontraba entre no satisfactoria y mala durante el período de estudio. En relación con los metales pesados (Pb, Cd, Ni, Cu, Cr), las concentraciones detectadas se encuentran por debajo de los máximos permisibles señalados en la Norma NOM026-SSA1-1993, en los criterios de la Organización Mundial de la Salud, de la Comunidad Europea y de la Agencia Ambiental Europea. Por lo tanto, las concentraciones detectadas de metales pesados no representaron peligro o riesgo a la salud; sin embargo la calidad del aire se clasificó como no satisfactoria debido a las altas concentraciones de material particulado (Cruz y col., 2013).

Ramírez y colaboradores publicaron en el 2006 un estudio enfocado a la caracterización física y química de las partículas atmosféricas presentes en los filtros de muestreadores de alto volumen de partículas  $\text{PM}_{10}$  y PST en tres zonas de la ciudad de Hermosillo y durante el Periodo de los años 2003 al 2005. Se utilizaron las técnicas de MEB equipado con EDS. Las partículas fueron analizadas de manera individual y los elementos encontrados en este estudio fueron Al, Ba, Bi, Br, Ca, Ce, Cl, Cr, Cu, Fe, K, La, Mn, Mg, Na, P, Pb S, Si, Ti, U, V, W, Y, Zn y Zr. Algunos de los elementos se encontraron en forma de sulfatos y muchos de ellos en elementos traza (Ramirez y col., 2007).

## 2.3 Métodos de Muestreo de Partículas

### 2.3.1 Equipos de medición de partículas en suspensión por filtración de alto volumen.

Estos equipos están dentro del muestreo activo. Los equipos de esta clase involucran un sistema de bombeo que obliga a una corriente de aire medida, a pasar por un sistema de retención, el cual usa un filtro de características especiales y suele ser de microfibra de vidrio o de cuarzo.

El muestreador de alto volumen consta básicamente de una bomba de vacío, portafiltro, adaptador de marco, controlador volumétrico de flujo (cuya función es ajustar a un caudal constante durante la toma de muestra) y un controlador de tiempo. En este equipo el aire es obligado a pasar por un filtro de baja resistencia, con un alto flujo.

La determinación de la concentración de partículas, se lleva a cabo mediante el método gravimétrico, donde se realiza el cálculo por medio de la diferencia en pesos del filtro antes y después del muestreo y el total del flujo de aire, para esto es necesario el acondicionamiento del filtro antes y después de la colección de partículas, el cual consiste en equilibrarlo a condiciones estables de temperatura y humedad relativa antes de pesarlos.

Existen dos tipos de muestreadores de partículas de alto volumen ampliamente conocidos, el muestreador de partículas totales en suspensión (High Volume Total Sampler Particle, HV-TSP) y el muestreador de partículas en suspensión menores de a 10 micrones de diámetro aerodinámico (High Volume PM<sub>10</sub> Sampler, HV-PM<sub>10</sub>). La Figura 2.1 muestra una imagen de ambos equipo muestreadores.



**Figura 2.1.** Equipos manuales de muestreo de partículas en suspensión, totales y menores a diez micrones de diámetro aerodinámico, por filtración de alto volumen de aire, disponibles en el mercado.

El muestreador de partículas PST captura aquellas de  $100\ \mu\text{m}$  y menores y el de  $\text{PM}_{10}$  aquellas de  $10\ \mu\text{m}$  y menores. Ambos están diseñados para discriminar las partículas de mayor tamaño y arrastrar en el flujo de aire solamente las de interés (Sbarato y col., 2000).

### **2.3.2 Captadores de partículas de bajo volumen**

Los captadores utilizan una bomba de vacío para aspirar el aire cargado de partículas y pasarlas a través de un cabezal de muestreo. Las partículas se ordenan por tamaño en etapas de separación que usan impactadores, y al final se depositan sobre filtros especiales de  $47\ \text{mm}$  de diámetro que pueden ser analizados por gravimetría o analíticamente. El caudal de aire se controla con un orificio de medición instalado entre el filtro y la bomba de vacío y se regula con precisión. La unidad está alojada en un armario de acero inoxidable con cerradura, que por su reducido tamaño y peso puede ser transportado fácilmente. La Figura 2.2 muestra un muestreador de partículas de bajo volumen disponible en el mercado.



**Figura 2.2.** Equipos automáticos de muestreo de partículas en suspensión,  $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$  por filtración de bajo volumen de aire, disponibles en el mercado.

## 2.4 Muestreadores de Partículas para Microbiología

La exposición microbiana en Interiores se ha relacionado con alergia y trastornos respiratorios. Sin embargo, la falta de metodología de muestreo normalizada es una problemática en la investigación de las relaciones dosis-respuesta entre la exposición a los microorganismos y los efectos en la salud (Frankel y col., 2012).

Existen distintos tipos de dispositivos para colectar las partículas suspendidas en la atmósfera así como para determinar su distribución por tamaño. Algunos muestreadores se han diseñados para colectar polvo o partículas no viables, mientras que otros se usan exclusivamente para la colecta de bioaerosoles o microorganismos. Los muestreadores de uso más frecuente en el área de la aerobiología para el aislamiento de bacterias se encuentran los de colecta por impactación y centrifugación.

El principio de colecta por impactación se basa en la tendencia de una partícula a desviarse del flujo de aire debido a la inercia, cuando la corriente de aire se curva al pasar por una superficie sólida o semisólida. Las partículas se separan de la corriente de aire y se impactan sobre la superficie. Entre éstos se encuentra el impactador de cascada, uno de los más usados en los estudios aerobiológicos es el impactador Andersen, existen diferentes modelos de una o varias etapas; otro es el impactador en líquido (impingers),

en este equipo de muestreo el aire succionado con una bomba de vacío se colecta directamente sobre un medio líquido.

La colecta de microorganismos por centrifugación permite la creación de un torbellino que produce que las partículas suspendidas en el aire se impacten sobre la superficie de colecta. El muestreador más común de este tipo es el Biotest RCS (Reuter Centrifugal Air Sampler, Alemania). En el Anexo I se puede encontrar una reseña más amplia respecto a estos tipos de muestreadores (Ine-Semarnat, 2004).

## 2.5 Métodos de Identificación de Microorganismos

Bou y col. (2011) presentan una revisión, con la finalidad de mostrar de manera breve y lo más concisa posible, una actualización de la metodología que se utiliza de manera habitual en el laboratorio de microbiología clínica, con el fin de identificar agentes etiológicos responsable de cuadros infecciosos. Esta revisión se enfoca en tres tipos de metodología: los métodos fenotípicos, moleculares y otros que recientemente se están utilizando en el laboratorio, los cuales están basados en métodos proteómicos. Los métodos más utilizados en el laboratorio son los fenotípicos y las técnicas de biología molecular. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. Existen en el mercado numerosos sistemas o equipos multipuebas que dan una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias, los cuales se pueden encontrar manuales o automatizados. Algunos de los sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas disponibles en el mercado son API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems y MicroID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen), etc. y de los sistemas comerciales automatizados disponibles en el mercado son MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix, etc. (Bou y col., 2011).

Borrego y col. (2008) realizaron un estudio para determinar la concentración microbiana del aire en depósitos del Archivo Nacional de Cuba, así como la identificación taxonómica de los hongos aislados y para definir el riesgo potencial que representan para el biodeterioro del patrimonio documental y la salud del personal. El muestreo microbiológico se realizó en verano e invierno en 6 depósitos, empleando un método de sedimentación. Para aislar hongos y bacterias se emplearon placas de Petri con medios de cultivo adecuados que se colocaron por triplicado a 3m de altura. Se determinó cualitativamente la actividad celulolítica, la producción de pigmentos y de ácidos a los hongos aislados. La microbiota viable total fue mayor en invierno que en verano. La concentración bacteriana fue significativamente superior

en el invierno (estación seca) en tanto que la fúngica fue más elevada en verano. Los géneros fúngicos que predominaron en invierno fueron *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Alternaria*. En verano prevaleció *Cladosporium*, y los géneros *Fusarium*, *Mucor* y *Chrysonilia* llegaron a alcanzar niveles significativos en algunos depósitos. Los hongos aislados degradaron celulosa, produjeron pigmentos y ácidos. Asimismo, se evidenció que pueden provocar estados alérgicos y enfermedades respiratorias a las personas. Con relación a las bacterias en el aire, predominaron las Gram positivas. Se identificaron los géneros *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. De igual manera, se detectó que las bacterias identificadas son capaces de afectar la salud del personal (Borrego y col., 2008).

Existe gran variedad de enfermedades ocasionadas por microorganismos que requieren un diagnóstico temprano. El descubrimiento temprano y el tratamiento adecuado para la infección bacteriana tienen un gran impacto ya que en la mayoría de las infecciones se tratan empíricamente con antibióticos de amplio espectro debido al tiempo que se requiere, de 24 a 48 h para el procesamiento microbiológico de rutina. Actualmente en pacientes en cuidado crítico, que requieren la detección temprana de ADN bacteriano en el torrente circulatorio, es posible analizar las muestras clínicas como sangre, plasma, fluido cerebroespinal y otros especímenes mediante PCR. En contraste con estos nuevos acercamientos de diagnóstico, los cultivos de sangre requieren más tiempo y a menudo brindan resultados falsos negativos, debido a baja sensibilidad (Pinilla y col., 2008).

En la práctica de la microbiología clínica se producen una serie de circunstancias en la identificación bacteriana como son: dificultades en el aislamiento, crecimiento lento o en medios de cultivo *in vitro* complejos, baja actividad en las pruebas bioquímicas, ausencia o baja efectividad de técnicas serológicas, etc. Estas situaciones, entre otras como la obtención de resultados reproducibles e intercambiables entre laboratorios, confieren a las técnicas moleculares, el reconocimiento como la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular (Rojano y col., 2013; Cornejo y col., 2014).

Reoun y col. (2006) realizaron un estudio de desarrollo y calibración de PCR en tiempo real para la cuantificación de microorganismos en el aire. El estudio describe la relación de la colección de bioaerosoles y el uso de PCR en tiempo real (RT-PCR) para cuantificar las bacterias del aire. La cantidad de bacterias colectadas determinadas por RT-PCR se compara con la cuantificación por técnicas convencionales, tales como el cultivo, la microscopía y el recuento de microorganismos del aire mediante el uso del contador óptico de partículas (COP). Los datos muestran que un enfoque experimental utilizado



para desarrollar curvas estándar para su uso con RT-PCR es crítico para una exacta cuantificación de muestras. Con el uso de “primers” universales en la reacción de PCR, usando SYBR Green como marcador de fluorescencia, se generaron 12 diferentes curvas de calibración que fueron utilizadas para cuantificar el organismo modelo *Escherichia coli* (*Migula*) *Catellani* de las muestras de aire. Las curvas de calibración preparadas utilizando un enfoque tradicional, donde se utilizó ADN genómico diluido en serie y extraído de bacterias cultivadas puras usadas en la reacción de PCR produjo una significativa subestimación de cantidades de muestra en comparación con la concentración de microorganismos en el aire, medido por el COP. La subestimación fue especialmente pronunciada en las curvas de calibración usando unidades formadoras de colonias (UFC). En contraste, la concentración de células en las muestras de aire estimada por RT-PCR fue más precisa (aprox. 60 % en comparación con la concentración de microorganismos en el aire), cuando la curva estándar fue construida utilizando aerosol de *E. coli*. La precisión mejorada (aprox. 100 %) cuando las muestras de aire utilizadas para construir las curvas estándar fueron diluidas primero, el ADN extraído de cada dilución fue amplificado por la RT-PCR para simular el manejo de las muestras de aire con desconocidos y posiblemente baja concentración. Los datos muestran que las curvas de calibración utilizadas para cuantificación por RT-PCR necesitan ser preparadas usando la misma matriz y procedimientos ambientales como la manipulación de las muestras del medio ambiente de que se trate. La confianza en las curvas de calibración generadas con suspensión bacteriana cultivada (enfoque tradicional) puede dar lugar a una subestimación considerable de las cantidades de microorganismos en muestras ambientales (Reoun y col., 2006).

Los métodos proteómicos, son métodos moleculares no basados en los ácidos nucleicos. Los principales son la cromatografía y la electroforesis.

La cromatografía separa moléculas según su tamaño, carga iónica o solubilidad en determinados disolventes. Puede utilizarse para separar proteínas, ácidos grasos de membrana, ácidos micólicos de la pared de las micobacterias y otros. Es de aplicación limitada en microbiología y solo se emplea para microorganismos difíciles de estudiar por otras técnicas. Por ejemplo, los anaerobios se pueden identificar por cromatografía de gases, viendo los perfiles de sus ácidos grasos de membrana.

La electroforesis se utiliza para el análisis de proteínas bacterianas, estudia la migración de partículas cargadas sobre un soporte sobre el que se aplica un campo eléctrico. Cada proteína tiene una carga iónica distinta y por tanto migra de diferente manera y mediante la comparación de los perfiles de cada cepa con patrones estándar se logra su identificación.

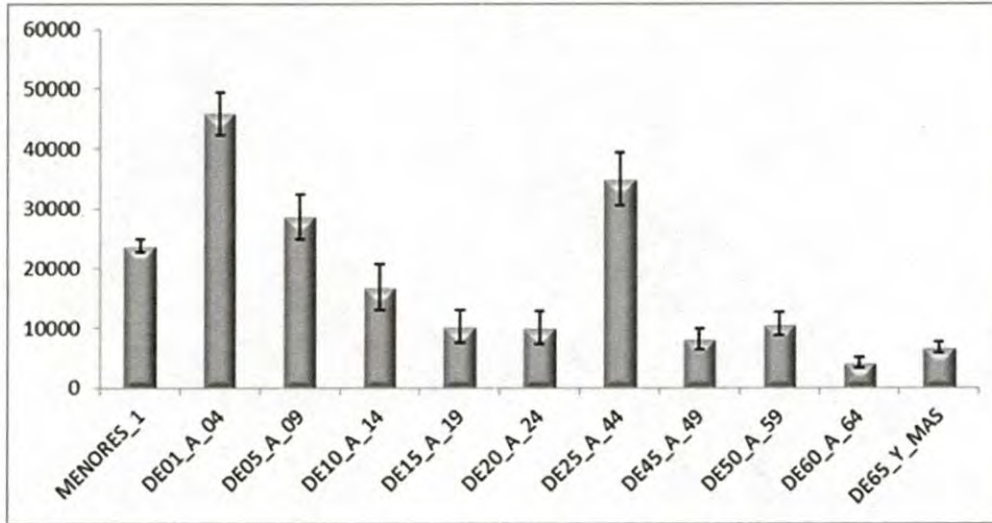
Zárate y col. (2014), realizaron un estudio con la finalidad de determinar la utilidad de la técnica MALDI-TOF MS (Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) para la identificación de aislamientos clínicos de bacterias anaerobias. Esta metodología permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a partir de colonias. Este análisis conduce a la creación de un espectro de masas que es característico para cada especie. En este estudio se analizaron 106 aislamientos de bacterias anaerobias mediante MALDI-TOF MS y por pruebas bioquímicas convencionales. El método convencional y el MALDI-TOF MS coincidieron a nivel de género y especie en un 95,3 % de los casos considerando la totalidad de los aislamientos estudiados. Los datos obtenidos en este estudio demuestran que la técnica MALDI-TOF MS ofrece la posibilidad de llegar a una adecuada identificación de bacterias anaerobias (Zárate y col., 2014).

Menetrez y col. (2009) realizaron una evaluación de las partículas biológicas en interiores y exteriores en Carolina del Norte y Denver USA. Un estudio de las fracciones de PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> de bioaerosoles del ambiente de zonas rurales y urbanas se llevó a cabo durante un período de seis meses para evaluar el potencial de concentraciones a largo plazo. Tres sitios separados fueron monitorizados, se recogieron y analizaron muestras para su masa y contenido biológico (endotoxinas, (1,3)-β-D-glucan y proteínas). Este estudio provee la caracterización de bioaerosoles del ambiente en una variedad de áreas y condiciones. Los filtros fueron analizados gravimétricamente. En el análisis de Denver, se utilizaron filtros de teflón de 37 mm, para las partículas PM<sub>2.5</sub>, operados con un muestreador de aire de bajo volumen (2 L/min). En Carolina del Norte se utilizaron filtros de teflón de 47 mm en muestreadores de aire de bajo volumen (16.7 L/min) para analizarlas partículas PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>. En la ciudad de Raleigh se utilizaron filtros de teflón de 25 mm con un flujo de aire de 29.6 L/min. Se realizó análisis gravimétrico de los filtros. Las concentraciones de estos bioaerosoles se reportaron como una función de la fracción de tamaño de las partículas, la masa y el volumen de aire muestreado. Los resultados indicaron que las concentraciones de productos biológicos fueron más altas en PM<sub>10</sub> que en PM<sub>2.5</sub>, excepto cuando existían carreteras cercanas. En el estudio se reportan elevadas concentraciones de polen en Carolina del Norte para el Periodo del 26 de Marzo al 4 de Abril del 2007 (Menetrez y col., 2009).

## 2.6 Infecciones Respiratorias en la Ciudad de Hermosillo

Las infecciones respiratorias agudas no son producidas por partículas inertes, pero son por un microorganismo que está asociado a ellas. En la ciudad de Hermosillo, las infecciones respiratorias agudas afectan principalmente a personas en edades entre 1 y 4 años (como se muestra en la Figura 2.3). Estos

datos se obtuvieron de un análisis realizado en los archivos del Hospital Infantil del Estado de Sonora. Las infecciones más comunes son: *Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae* y *Pseudomonas*. Sin embargo, no hay evidencia de que estas bacterias se encuentren en el aire.



**Figura 2.3.** Número de IRA's en la ciudad de Hermosillo Sonora, México durante el Periodo 2006-2010.

Fuente: Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES).

Esta información coincide con lo publicado por Cruz y col. (2013) quienes reportan a las infecciones respiratorias agudas como indicadores de afectación a la salud, las cuales ocuparon el primer lugar de atención en el servicio de urgencias y de hospitalización del Instituto Mexicano del Seguro Social en Hermosillo. También reportan que de acuerdo a la Secretaría de Salud Pública (Gobierno del Estado de Sonora, 2002), para las enfermedades por grupos de edad se estableció que para el Municipio de Hermosillo durante el año 2001 las IRAS fueron 248 104 casos, representando 3761.9 por cada 10 000 habitantes. El grupo de edad de 1 a 4 años fue el que reportó más eventos con 63 238 seguido del grupo de 25 a 44 años con 44 929; los siguientes dos grupos de edad con mayor índice fueron los de menos de 1 año con 35 701 y el de 5 a 9 años con 34 961 casos. De esta manera, el rango de edad de 0 a 9 años suma 133 900 incidentes que representaron el 54 % de las enfermedades respiratorias agudas para este municipio en ese año (Cruz y col., 2013).

## CAPÍTULO III

## MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de proporcionar un contexto de orden en dicho trabajo, se planteó un diagrama general el cual muestra de forma práctica las diferentes etapas y aspectos generales a considerar en la investigación. En la Figura 3.1, se muestra el diagrama donde se puede observar la estructura y el orden seguido durante este trabajo para cumplir con los objetivos trazados en la investigación.

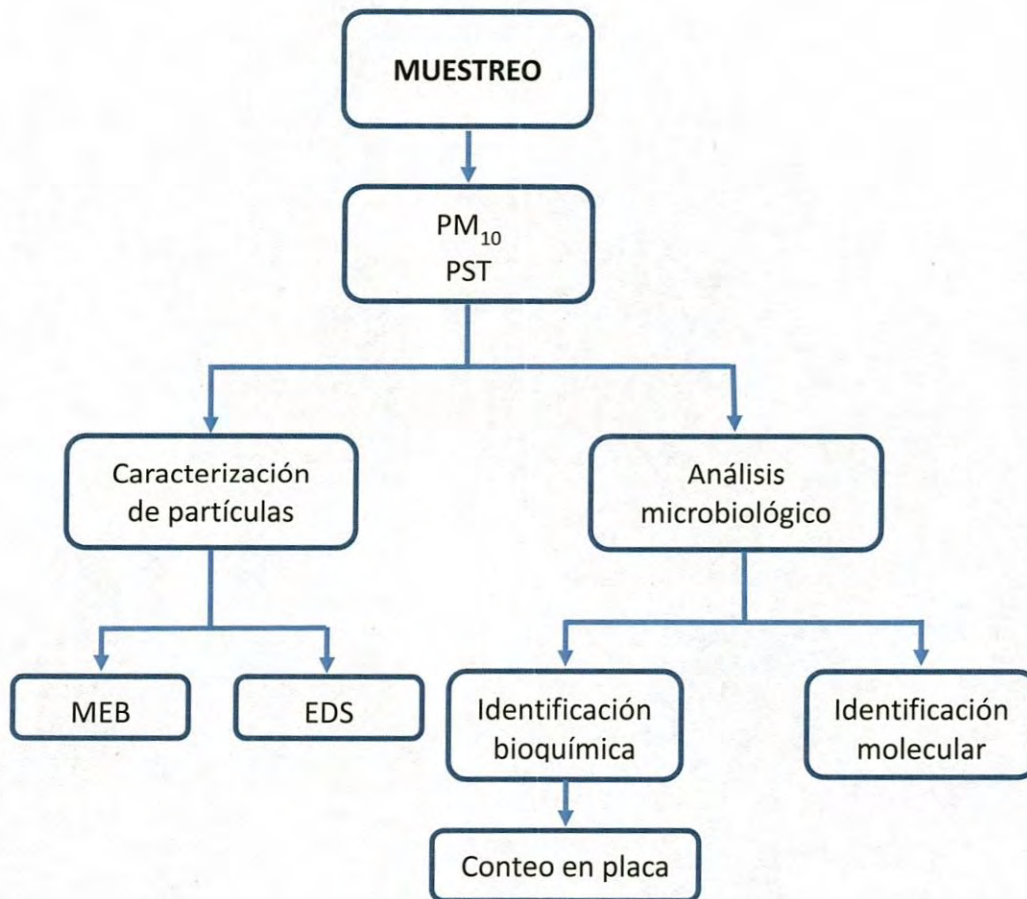


Figura 3.1. Diagrama general.

### 3.1. Área de Estudio

Los muestreadores de alto volumen fueron estratégicamente ubicados en cuatro estaciones en la ciudad de Hermosillo, localizados cada uno de ellos en los siguientes sitios:

Estación Sur: Colegio de Bachilleres (COBACH) Plantel Villa de Seris, Blvd. Agustín de Vildósola esquina Avenida de Bachilleres, Colonia Emiliano Zapata, al Sur de la Ciudad, con coordenadas  $29^{\circ} 02' 40.15''$  N y  $110^{\circ} 57' 30.46''$  O. Este sitio se encuentra rodeado por áreas residenciales y oficinas comerciales, así como vías de alto tráfico y caminos sin pavimentar.

Estación Centro: Edificio de la Dirección de Inspección y Vigilancia del Ayuntamiento de Hermosillo, en Avenida Morelia No. 220 entre Carbó y Palma, Colonia Casa Blanca, en el Centro de la Ciudad, con coordenadas  $29^{\circ} 04' 44.01''$  N y  $110^{\circ} 56' 31.91''$  O, rodeada por áreas residenciales, oficinas comerciales y calles de alto tráfico vehicular.

Estación Norte: Universidad del Estado de Sonora (UES antes CESUES), en Ley Federal del Trabajo y Calle 3 en la Colonia Apolo en el Norte de la Ciudad, con coordenadas  $29^{\circ} 07' 17.70''$  N y  $110^{\circ} 57' 40.12''$  O, rodeada por área residencial y calles con tráfico vehicular medio.

Estación Noroeste: en Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios (CBTIS 206) en Colombia y Pótam s/n Fraccionamiento Camino Real con coordenadas  $29^{\circ} 07' 07.25''$  N y  $111^{\circ} 00' 23.86''$  O, rodeada por área residencial y calles sin pavimentar. En la Figura 3.2 se muestra el mapa de la ciudad de Hermosillo, indicando los sitios donde se encuentran localizadas las estaciones de muestreo.

El clima en el Centro de Población de Hermosillo es un clima desértico (muy seco),  $BW(h)hw(x')$ , bajo la clasificación de Koppen, con una condición de temperatura de tipo cálido, con un régimen de lluvia de verano y escasa todo el año, con un porcentaje de lluvia  $> 10.2$  mm para lluvia de verano y  $< 36$  mm para lluvia de invierno. Presenta una temperatura media anual  $> 22$  °C, y la temperatura del mes más frío  $< 18$  °C. En el Centro de población de Hermosillo el mes más frío es Diciembre con una temperatura mínima promedio de  $3.5$  °C y el mes más caluroso es Junio con una temperatura máxima promedio de  $45$  °C. El mes en el cual se presenta la mayor humedad relativa es Diciembre con un máximo promedio de  $62$  % y el mes con menos humedad relativa es Abril con un porcentaje mínimo promedio de  $24.6$  %. Las precipitaciones pluviales más elevadas se presentan en verano durante los meses de Julio, Agosto y Septiembre, coincidiendo con la temporada de huracanes y registrándose una humedad relativa

promedio del 53 %. En los meses de Marzo a Junio y en Octubre la presencia de lluvias es mínima, con una humedad relativa del 30 %. La precipitación media anual es de 348.6 mm. (Hermosillo, 2014). La vegetación, de acuerdo a la superficie municipal ocupa: agricultura el 14.64 %, bosque el 0.06 %, matorral el 74.75 %, pastizal el 3.03 % y otros el 7.52%. Los vientos dominantes se dirigen en sentido Suroeste-Noreste por la mañana y en sentido contrario por la tarde (Cruz y col., 2013).

### 3.2 Muestreo

Tres Periodos de muestreo fueron analizados durante el año 2011 en cuatro diferentes estaciones. Se obtuvieron muestras cada seis días por estación de muestreo siguiendo el protocolo de la Norma Oficial Mexicana (Dof, 2005).

Para capturar las partículas con diámetro aerodinámico de 10 micras ( $PM_{10}$ ) se utilizaron 2 muestreadores de alto volumen marca Wedding & Associates, modelo 600 en las estaciones Norte y Noroeste y un muestreador de alto volumen marca Tisch Environmental modelo TE-6070 en la estación Sur, con un filtro de fibra de cuarzo marca Whatman, mientras que para las Partículas Sólidas Totales (PST) se usó un muestreador de alto volumen marca Tisch Environmental modelo TE-5000, con un filtro de fibra de vidrio. El tamaño del filtro fue de 20.3 x 25.4 cm. El muestreador de  $PM_{10}$  operó con un flujo de aire de 1.02 a 1.24  $m^3/min$  y de 1.1 a 1.7  $m^3/min$  el de PST, por un Periodo de 24 horas consecutivas. Los muestreadores usados son propiedad del Instituto Municipal de Ecología del Ayuntamiento de Hermosillo y empleados en el Programa de Evaluación y Mejoramiento de la Calidad del Aire (PEMCA).

Se eligieron tres Periodos de muestreo que fueran representativos de todo un año, por lo que se decidió seleccionar los Periodos de invierno y verano y uno adicional donde se presentan los mayores problemas de infecciones respiratorias o de alergias en la población como son los cambios de clima, por lo que se escogió el Periodo de primavera.

Los Periodos de muestreo se realizaron por un mes, para el Periodo de invierno comprendido en las fechas del 8 al 26 de Febrero, el de primavera del 27 de Abril al 15 de Mayo y el de verano del 25 de Agosto al 12 de Septiembre. La frecuencia de muestreo realizada por el PEMCA es de 6 días de acuerdo al cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-035-ECOL-1993 en cuanto a la medición para el cálculo y presentación del reporte de resultados de concentración.

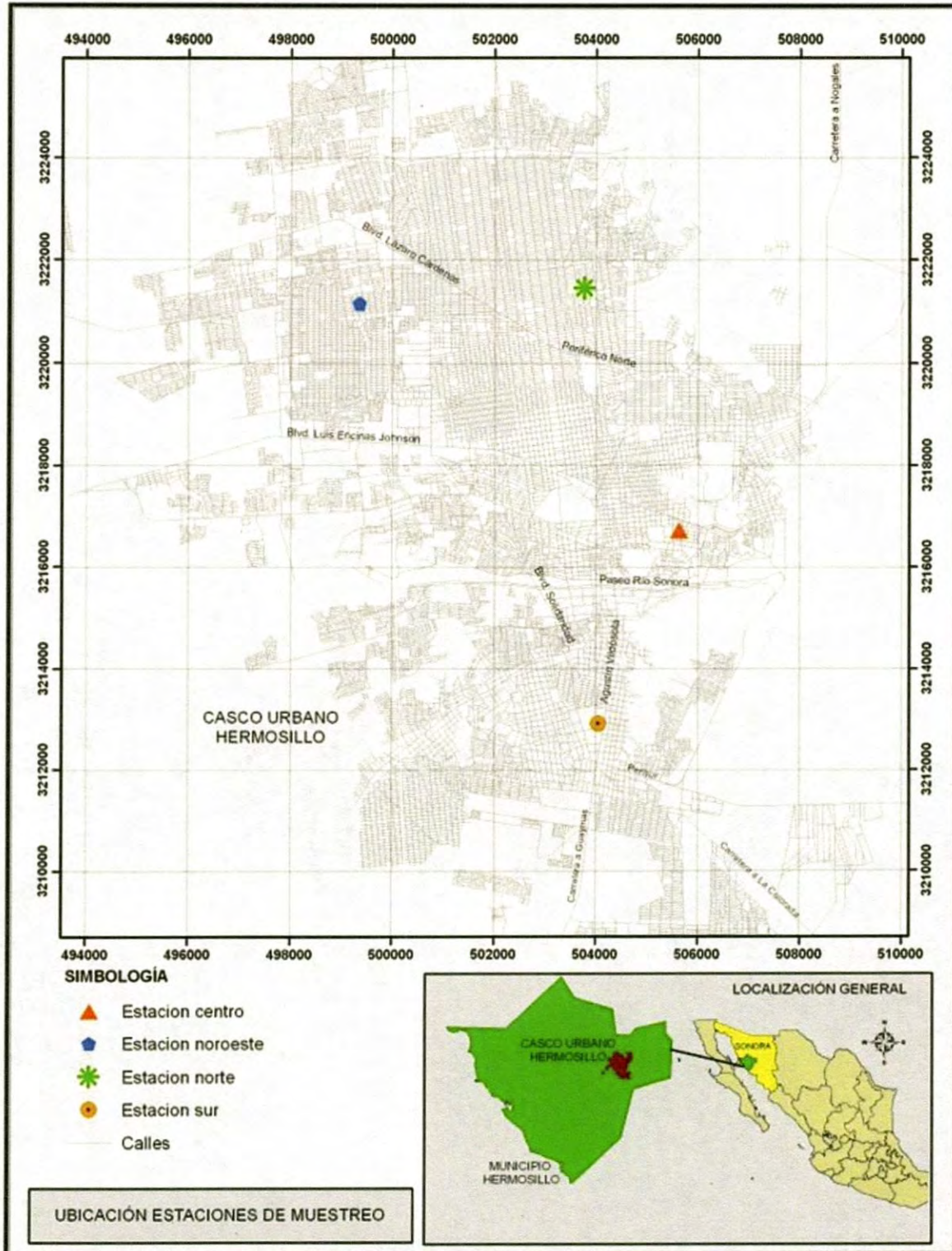


Figura 3.2. Mapa de la ciudad de Hermosillo donde se muestran las ubicaciones de las estaciones de muestreo.

### 3.3 Caracterización de Partículas

El análisis de partículas se basa en el diámetro de las mismas; las partículas se clasifican en: 1) partículas suspendidas totales (PST) diámetro hasta 100 micras, 2) inhalables o respirables ( $PM_{10}$ ), cuyo diámetro es menor a 10 micras, 3) finas con diámetro menor a 2.5 micras ( $PM_{2.5}$ ) y 4) ultrafinas cuyo diámetro es menor a 1 micra ( $PM_1$ ) (Pérez y col., 2010).

Partículas gruesas y finas difieren no sólo en tamaño sino también en muchas otras características, tales como la composición, tiempos de vida en suspensión, la variabilidad temporal y espacial, los mecanismos de formación, tipos de fuentes y efectos sobre la salud. Debido a estas diferencias, las partículas atmosféricas se deben tomar consideraciones y realizar estudios por separado (Branis y Safranek, 2011).

#### 3.3.1 Concentración de partículas $PM_{10}$ y PST

La concentración de partículas respirables a condiciones estándar ( $P = 760\text{mmHg}$  and  $T = 298\text{ K}$ ) se determina mediante la relación de la masa de partículas colectadas y el volumen total de aire succionado por el equipo durante el tiempo de muestreo (24 horas) siguiendo el protocolo establecido en el Código Federal de Regulación de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (Usepa, 1992). Para determinar la concentración de partículas se realizó primeramente el análisis gravimétrico de los filtros, los cuales fueron estabilizados y pesados antes y después del muestreo bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura. Los filtros se mantuvieron por 24 horas en un desecador con indicador de humedad. Se utilizó una Balanza Electrónica Analítica (Sartorius Modelo A200S-D1B) instalada sobre una mesa anti vibración. Los filtros fueron manejados con guantes libres de talco.

Para el cálculo de la concentración de  $PM_{10}$  se usó la siguiente ecuación:

$$PM_{10} = \frac{(P2 - P1) \times 10^6}{V}$$

Donde

P1 = Peso inicial

P2 = Peso final

V = Volumen de aire muestreado



El volumen de aire muestreado se calculó mediante la ecuación:

$$V = Q_{std} \times 60 \times \text{horas de muestreo}$$

Donde

$Q_{std}$  = Flujo estándar

El flujo estándar se determinó mediante la fórmula:

$$Q_{std} = \frac{Q_a (\text{Presión promedio durante el muestreo} \times 298 \text{ K})}{760 \text{ mmHg} \times \text{Temp prom durante el muestreo}}$$

Donde

$Q_a$  = Flujo volumétrico actual

Se obtuvo el flujo volumétrico actual mediante el uso de la Look up table (manual del equipo) donde se calculó el índice de presión ( $P_o/P_a$ ) mediante la fórmula:

$$\frac{P_o}{P_a} = 1 - \left( \frac{P_f}{P_a} \right)$$

Donde

$P_a$  = Presión patrón (760 mmHg)

$P_f$  = Promedio de la caída de Presión

Donde

$$P_f = \frac{\text{Pulgadas de } H_2O}{13.6 \times 25.4}$$

Se determinó el promedio de la caída de presión del equipo empleando los datos de las lecturas tomadas antes y al final del muestreo con el manómetro de agua.

Para el cálculo de la concentración de PST se usó la siguiente ecuación:

$$PST = \frac{(P2 - P1) \times 10^6}{V}$$

Donde

P1 = Peso inicial

P2 = Peso final

V = Volumen

El volumen se calculó mediante la ecuación:

$$V = Q_{ptn} \times t$$

Donde

$Q_{ptn}$  = Flujo Patrón

T = Tiempo

Para el cálculo de  $Q_{ptn}$  se usó la ecuación:

$$Q_{ptn} = \frac{1}{m} \left[ \left( I \sqrt{\frac{P_3}{P_{ptn}} \frac{T_{ptn}}{T_3}} \right) - b \right]$$

Donde

m = Pendiente de la recta de la curva de calibración del muestreador

I = Flujo promedio indicado en el registrador de flujo (carta Dickson)

$P_3$  = Presión barométrica promedio durante el período de muestreo (en mmHg)

$T_3$  = Temperatura promedio durante el período de muestreo (en grados Kelvin)

$P_{ptn}$  = Presión patrón 101 KPa o 760 mmHg

$T_{ptn}$  = Temperatura patrón en grados Kelvin (298).

b = Punto de intersección de la recta de la curva de calibración del muestreador.

### 3.3.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Dos factores importantes a considerar en relación a las partículas atmosféricas son: su tamaño y composición química; ya que estos influyen directamente en la salud de la población, es por eso la importancia de llevar a cabo su caracterización con la finalidad de conocer su composición, la distribución del tamaño de partícula y su morfología.

Para lograr la caracterización de las partículas atmosféricas se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido, por lo que se hizo uso del equipo del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en la ciudad de La Paz B. C. S., el cual cuenta con los siguientes equipos:

Microscopio electrónico con una magnificación máxima hasta 300,000 aumentos (HITACHI, S-3000N Scanning Electron Microscope).

Sistema de microanálisis EDS Inca x-sight.

Secado a punto crítico Samdri-PVT-3B.

Metalizador Dentom Vacuum Desk II.

Detector BSD (backscattered).

Detector SE (Secondary Electron).

Detector EDX (X-ray).

En el Anexo I, se puede encontrar información del funcionamiento del microscopio electrónico de barrido, de los diversos detectores de señales, así como de los diferentes fenómenos que se presentan durante la interacción de los electrones con las muestras analizadas.

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de los filtros, se realizó un arreglo de muestras para facilitar el manejo y disminuir los tiempos de análisis de las mismas, de tal forma que se pudiera trabajar con el mayor número posible de muestras. La Figura 3.3 muestra el arreglo realizado para el tratamiento y manejo de las muestras, tanto para el secado, el recubrimiento metalizado, así como el manejo en el

interior del microscopio para el análisis por barrido y EDS. Se utilizaron placas de lámina de aluminio con cinta adhesiva para el manejo de las muestras de los filtros.

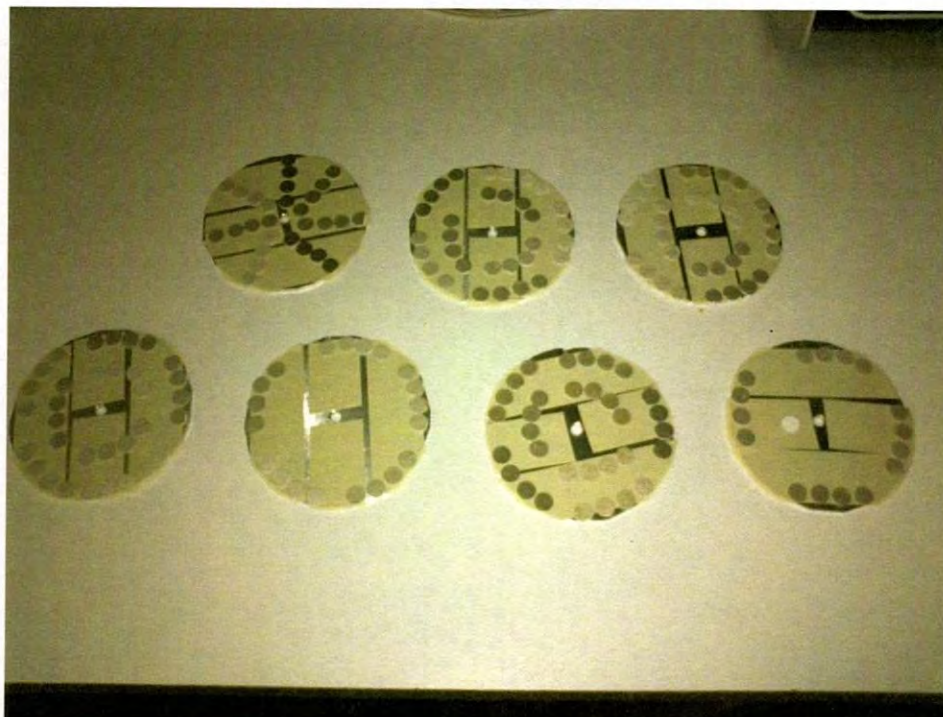


Figura 3.3 Arreglos de las muestras para su manejo en el microscopio.

### 3.3.3 Espectroscopia de energía de dispersión de rayos X.

El microscopio de barrido electrónico tiene integrado un sistema de microanálisis por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X, EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy), Modelo Inca x-sight EDS System de Oxford, con un detector de silicio para elementos ligeros y resolución de 138 eV, el cual se utilizó para determinar la composición química de las partículas atmosféricas.

Se tomaron cuatro muestras por filtro para realizar el análisis, de las cuales se eligieron al azar tres sitios para realizar los estudios. Para el microanálisis, de los tres sitios analizados se determinó un promedio de los valores registrados para cada uno de los elementos químicos detectados.

### 3.3.4 Distribución del tamaño de partículas de $PM_{10}$ y PST.

Las partículas atmosféricas no son idénticas química y físicamente, sino más bien están constituidas por una amplia gama de propiedades morfológicas, químicas, físicas, termodinámicas y de tamaños. Una de las características más importantes de las partículas es su distribución de tamaños ya que es el tamaño el

que determina los tiempos de permanencia de las partículas en suspensión en el aire o en su defecto su precipitación. Las partículas finas, aquellas que miden menos de 10 micras de diámetro, son las que permanecen por más tiempo suspendidas en el aire y son las que penetran más fácilmente al tracto respiratorio, por lo que son consideradas de mayor riesgo para la salud de la población, de ahí su importancia de conocer su distribución.

Se realizó una medición de partículas en las micrografías logradas con el microscopio electrónico de barrido mediante el uso del software Piximetre 5.5 importando las imágenes y calibrando el medidor en cada una de ellas. De este se obtiene un listado de los valores de las mediciones realizadas. Con la ayuda del programa SigmaPlot 11 se obtuvieron gráficas de histogramas que muestran la frecuencia de los diferentes intervalos de medidas de las partículas.

### **3.4 Análisis Microbiológico por Pruebas Bioquímicas**

Las bacterias suspendidas en la atmósfera generalmente se encuentran asociadas a partículas. La presencia de las bacterias en la atmósfera ha sido demostrada por su crecimiento en medios de cultivo (denominándose cultivables); sin embargo, se considera que esto representa sólo una pequeña fracción de la población que llega a la atmósfera, de forma tal que la mayoría podría estar muerta o encontrarse en forma viable no cultivable. Los microorganismos son y siempre han sido un factor importante para la salud humana. La vida se inició en forma de microorganismos y estos han desarrollado una extraordinaria capacidad de supervivencia que les ha permitido colonizar prácticamente cualquier espacio natural de la tierra y por supuesto también los hábitats artificiales creados por el ser humano para sobrevivir y uno de los métodos de identificación de uso más frecuente en el área de la aerobiología para el aislamiento de bacterias se encuentran los de colecta por impactación y centrifugación.

#### **3.4.1 Toma de muestras**

Una vez llevada a cabo la estabilización y pesada de los filtros, se realizó la toma de muestras para el análisis bacteriológico a través del uso de técnicas tradicionales de identificación de microorganismos.

Las muestras para el análisis se obtuvieron de los filtros PM<sub>10</sub> y PST, de los cuales se tomaron pequeñas porciones con un área de 28.27 mm<sup>2</sup>. El número de muestras por filtro fue calculado tomando en consideración que el filtro tiene un área de muestreo de 41,617.50 mm<sup>2</sup> y un volumen de aire muestreado de 1627.2 m<sup>3</sup> en 24 horas. La unidad de área para muestra considerada fue de 28.27 mm<sup>2</sup> debido a que

es la medida estándar del muestreador usado. Se usó la fórmula de Canon y Roe tomando en consideración que la prevalencia esperada de bacterias en el filtro fuera del 50 % y la sensibilidad de las técnicas empleadas del 95 %. De acuerdo a estas operaciones el número de unidades de muestreo fueron cuatro.

### 3.4.2 Análisis microbiológico

De las cuatro fechas de muestreo por Periodo se consideró realizar el análisis microbiológico con técnicas tradicionales de identificación de microorganismos durante el primero y el último día de cada Periodo, por lo que las fechas seleccionadas fueron el 8 y 26 de Febrero para el primer Periodo, 27 de Abril y 15 de Mayo para el segundo y 25 de Agosto y 12 de Septiembre para el tercer Periodo.

Con la finalidad de mantener una secuencia y orden en las pruebas realizadas, se diseñó un algoritmo de identificación de microorganismos, el cual se puede observar en la Figura 3.4.

Las muestras tomadas de los filtros se colocaron en tubos con caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Los siguientes medios enriquecidos de cultivo, se utilizaron para la incubación de las muestras: agar sangre y agar chocolate. Las colonias fueron seleccionadas de acuerdo a la diferenciación morfológica y se utilizó la tinción Gram para diferenciar la morfología celular. A los cocos Gram positivos se les aplicó la prueba de la Catalasa para diferenciar *Staphylococcus sp* y *Streptococcus sp*. Los cocos Gram positivos que resultaron negativos a la catalasa se cultivaron en medio selectivo KF. Los bacilos Gram negativos se cultivaron en agar Mac Conkey y a los microorganismos que se desarrollaron se les aplicó la prueba de la Oxidasa. La identificación de los microorganismos aislados se realizó mediante pruebas bioquímicas recomendadas en el Manual de Bergey's (Breed y col., 1957) para cada caso en particular.

En diversos estudios microbiológicos se requiere conocer el número de microorganismos presentes en un material con objeto de determinar su calidad. El procedimiento es esencialmente el mismo que para la medida del crecimiento de las poblaciones de bacterias. El crecimiento de poblaciones microbianas puede determinarse mediante métodos de medida de la masa total celular, que generalmente es directamente proporcional al número de células, (métodos de determinación del peso, de la actividad del cultivo o métodos turbidimétricos) o por la determinación del número de células.

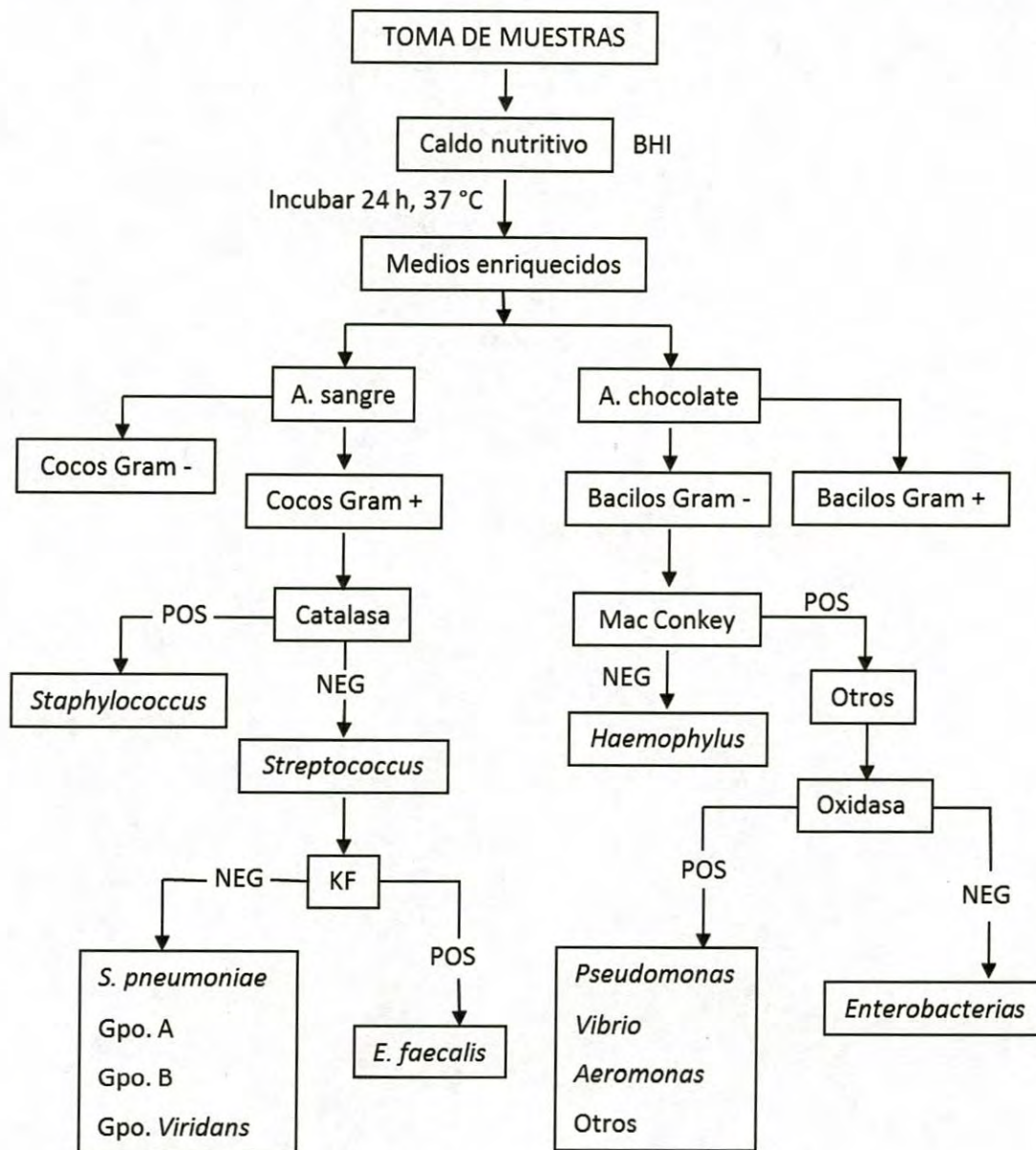


Figura 3.4. Algoritmo de identificación de microorganismos.

Las unidades formadoras de colonias fueron contadas del total de microorganismos de los filtros. La concentración se calculó para un área muestreada de 41,617.50 mm<sup>2</sup> y un volumen de aire muestreado de 1627.20 m<sup>3</sup> en 24 horas y de acuerdo a los procedimientos establecidos en la NOM-113-SSA1-1994 (Ssa, 1994).

### 3.5 Análisis Microbiológico por Biología Molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa un avance trascendental en el campo de la biología molecular; en particular, en el análisis de ADN (o ARN). Con esta técnica, una secuencia dada de ADN puede ser amplificada, incluso de pequeñas cantidades de material de inicio. La técnica de PCR es específica, sencilla y rápida; en el caso del PCR en tiempo real, debido a su alta sensibilidad y velocidad de detección, puede realizar análisis de ADN o ARN de manera cuantitativa y cualitativa, por lo que ha sido ampliamente aplicada en la investigación de aerosoles microbianos en años recientes (Li y col., 2013).

#### 3.5.1. Estandarización de la técnica

Aunque la aplicación de la PCR en tiempo real ha sido aplicada en la investigación, de manera general, para cuantificación de ADN en el presente estudio se utilizó para la identificación de microorganismos presentes en las partículas atmosféricas. Debido a que existe un campo bastante amplio en relación a microorganismos en el aire, lo cual requiere, para su identificación, estandarización de técnicas de amplificación de ADN para cada uno de ellos, se tomó como microorganismo modelo el *Enterococcus faecalis* para llevar a cabo la estandarización de la técnica de PCR. Tomando como base los resultados obtenidos en la identificación de bacterias mediante las técnicas tradicionales, donde el microorganismo de mayor prevalencia fue *E. faecalis*, se seleccionó éste para trabajar en la estandarización de la técnica.

##### 3.5.1.1 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular. Dos aspectos críticos en el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y que afecta la garantía de éxito en los resultados son la calidad y pureza del ADN, lo cual requiere una estandarización de la técnica de extracción de ácidos nucleicos que garantice que sea puro, no degradado, libre de ARN y de inhibidores de la reacción (Fraga y col., 2004).

Se utilizó el protocolo de Gene Clean para la extracción de ADN, el cual se puede encontrar en el Anexo II. El procedimiento en general para la extracción de ADN mediante el método de Gene Clean comprende el rompimiento de la célula en solución de lisis, captura del ADN mediante sílica o matriz (Gene Clean), lavados para eliminar proteínas con solución de lavado (EtOH) y la recuperación del ADN con agua, la cual rompe el enlace entre la sílica y el ADN.



La cuantificación del ADN extraído, se llevó a cabo en el espectrofotómetro marca Thermo Scientific, modelo NANO DROP 2000, empleado para cuantificación de las concentraciones de ácidos nucleicos y proteínas, el cual requiere solo 1  $\mu$ L de muestra para la medición. Este equipo además de valores de concentración también proporciona valores de la relación ADN/proteína la cual nos indica la pureza de la muestra de ADN obtenida en cada muestra, por lo que para su evaluación se obtuvieron los valores de absorbancia a 260 nm que es la longitud de onda de absorción máxima del ADN y 280 nm que es la longitud de onda de absorción máxima de las proteínas (principal impureza en preparaciones de ADN) (Weighardt, 2011), en un espectrofotómetro para poder evaluar la pureza de los ácidos nucleicos en la muestra y donde aplica la siguiente fórmula:

$$Pureza = \frac{Abs\ 260}{Abs\ 280}$$

Se realizó la cuantificación por triplicado de cada muestra con el fin de reducir cualquier error que se pudiera haber producido en las lecturas y con esto determinar un promedio de las mediciones para comprobar la calidad de la extracción de ADN.

El procedimiento de cuantificación y uso del nanodrop se puede encontrar en el anexo II.

### **3.5.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa**

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular, que permite la amplificación selectiva de una región o secuencia específica de ADN in vitro. Este proceso es altamente sensitivo y requiere solo de pequeñas cantidades de ADN blanco para su amplificación. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Esta técnica forma parte importante en el diagnóstico de enfermedades asociadas a una gran variedad de patógenos de naturaleza micótica, viral y bacteriana ( Rojas, 2006). La PCR en tiempo real se ha aplicado para detectar la presencia de microorganismos peligrosos en muestras de aire, agentes biológica y hongos asociados con efectos adversos para la salud. Recientemente, el PCR en tiempo real se está desarrollando gradualmente como una herramienta prometedora de detección y cuantificación de microorganismos en el aire en diferentes muestras ambientales. Los resultados indicaron que la PCR en tiempo real es específica, rápida y altamente sensible y puede proporcionar la determinación cuantitativa de la concentración de aerosoles microbianos y tiene buenas perspectivas de aplicación en la detección de microorganismos en el aire (Li, (Li y col., 2013).

### 3.5.1.2.1 Selección de “primers”

Los iniciadores o “primers” son fragmentos de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción en la replicación de ADN (Cornejo y col., 2014). Se seleccionaron “primers” recomendados por MLST (Multi Locus Sequence Typing) el cual utiliza un enfoque basado en la secuencia de nucleótidos para la caracterización de aislados de bacterias y otros organismos a través de Internet. En la Tabla 3.1 se pueden observar los primers recomendados para identificación de *E. faecalis* así como el gen al que corresponden, su secuencia y el tamaño del amplicón de cada uno de ellos (Ruiz y col., 2006).

**Tabla 3.1. Primers para identificación de *E. faecalis*.**

Gen	Secuencia	Tamaño del amplicón
<b>glucosa-6-fosfato deshidrogenasa</b>		
<i>gdh-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
<i>gdh-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<b>gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</b>		
<i>gyd-1</i>	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC	395
<i>gyd-2</i>	CATTTGTTGTCATACCAAGC	
<b>phosphate ATP binding cassette transporter</b>		
<i>pstS-1</i>	CGGAACAGGACTTTTCGC	583
<i>pstS-2</i>	ATTTACATCACGTTCTACTTGC	
<b>glucoquinasa</b>		
<i>gki-1</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
<i>gki-2</i>	ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	
<b>shikimato-5-deshidrogenasa</b>		
<i>aroE-1</i>	TGGAAAACCTTACGGAGACAGC	459
<i>aroE-2</i>	GTCCTGTCCATTGTTCAAAGC	
<b>fosforibosiltransferasa xantina</b>		
<i>xpt-1</i>	AAAATGATGGCCGTGATTAGG	456
<i>xpt-2</i>	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
<b>acetil-CoA acetiltransferasa</b>		
<i>yiqL-1</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
<i>yiqL-2</i>	GAATATCCCTTCTGCTTGCT	

### 3.5.1.2.2 Dilución de "primers" y gradiente de temperatura

Los "primers" se reciben liofilizados por lo que es necesario prepararse o rehidratarse para recuperar las condiciones originales mediante la adición de agua ultrapura. La cantidad de agua a adicionar depende del peso molecular, la densidad óptica y el factor de dilución considerado. La compañía proveedora del producto proporciona como dato particular de éste, el peso molecular y la densidad óptica, por lo que es necesario calcular el factor de dilución, el cual está determinado por la ecuación:

$$X = \frac{PM/10}{DO * 33}$$

Donde

X = Factor de dilución

PM = Peso molecular

DO = Densidad óptica

La cantidad de agua a adicionar al primer liofilizado está determinada por la ecuación:

$$\mu L \text{ de agua} = \frac{1000}{2X}$$

$\mu L$  de agua = Cantidad de agua ultrapura a agregar al "primer" liofilizado

X = Factor de dilución

La cantidad de  $\mu L$  de agua resultante va a determinar la concentración del primer en su estado original que es de 200 mM, a partir de esta concentración se realizan las diluciones para trabajar en la preparación de las reacciones para la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Estudios previos recomiendan concentraciones diluidas de "primers" a 20 mM para emplear en PCR tiempo real; sin embargo, también recomiendan realizar pruebas previas con concentraciones a 10 mM, 5 mM y 2.5 mM para ver el comportamiento de la reacción a las diferentes concentraciones.

Para determinar la concentración requerida se empleó la ecuación 3.

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2 \quad (3)$$

Donde

$V_1$  es el volumen de la solución concentrada que se debe de añadir para preparar la solución diluida

$C_1$  es la concentración de la solución concentrada

$V_2$  es el volumen de la solución diluida

$C_2$  es la concentración de la solución diluida

Por lo que para llevar a una concentración requerida a 100  $\mu\text{L}$ , la cual es una cantidad suficiente para trabajar en las pruebas, se determina el volumen de la solución concentrada  $V_1$  para añadir y completar los 100  $\mu\text{L}$  de la solución diluida, por lo que se determinó mediante la ecuación 4.

$$V_1 = \frac{V_2 * C_2}{C_1} \quad (4)$$

En conjunto con las diluciones de “primers” se realizaron varias pruebas de PCR con variación de la temperatura para evaluar su comportamiento aplicando un gradiente de temperatura con incrementos de 2 °C en cada PCR y en un intervalo de 52 a 62 °C.

#### **3.5.1.2.3 Condiciones de amplificación**

El equipo utilizado para llevar a cabo los PCR fue el termociclador convencional, marca Techne, modelo TC-412 y el termociclador tiempo real, marca Roche, modelo Light Cyclor 480 II; en ambos se realizaron ciclos de pruebas para determinar cuál presentaba mejores resultados y finalmente las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador tiempo real. Ambos equipos tienen capacidad para procesar 96 muestras en un mismo proceso. Se probaron varios protocolos de condiciones para las reacciones de amplificación de las cuales el que presentó mejores resultados se muestran en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Protocolo de amplificación de ADN de muestras de filtros para identificar *E. faecalis***

ETAPAS	FASE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS
Desnaturalización	Desnaturalización inicial	94	5	1
Amplificación	Desnaturalización	94	0.5	
	Alineamiento de primers	52	0.5	40
	Extensión	72	0.5	
Extensión	Extensión final	72	7	1

Para la reacción de PCR se siguió el protocolo de iQ SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, donde se utilizaron los “primers” forward y reverse yiqL-1 y yiqL-2 respectivamente, utilizando las siguientes cantidades para la reacción con 3  $\mu$ L de muestra.

7.5  $\mu$ L Master Mix (iQ SYBR)

2.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O DEPC

0.5  $\mu$ L Primer Forward

0.5  $\mu$ L Primer Reverse

#### **3.5.1.2.4 Variación del volumen de DNA en la reacción de PCR**

Con la finalidad de seleccionar el volumen correcto de ADN, se realizaron pruebas de PCR utilizando diferentes volúmenes de ADN en las reacciones. Las pruebas se realizaron utilizando 1, 2 y 3  $\mu$ L en dos tipos de muestras positivas para observar su comportamiento.

#### **3.5.1.2.5 Estudio de la especificidad de la amplificación**

Especificidad de la amplificación se refiere a la generación de un único producto amplificado en la reacción, ésta viene determinada por los oligos y la exclusividad con la que se unen al ADN molde, de esta forma, si los oligos tienen más de un sitio al que se pueden unir se presentará más de un producto amplificado, lo cual se traduce en una baja especificidad del producto.

Se realizó PCR de algunas cepas de microorganismos otorgadas por el laboratorio de microbiología del CIBNOR Hermosillo con la finalidad de determinar si existía amplificación de las muestras consideradas

adicionales al control positivo (*E. faecalis*). El ADN de las muestras incluidas en la reacción fue ADN de los microorganismos *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922, *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomona aeruginosa*. Aunque estas muestras no se encuentran referenciadas por la ATCC, a excepción de *Escherichia coli*, fueron adquiridas y analizadas por el laboratorio de microbiología del CIBNOR Hermosillo, lo cual brinda confianza en su utilización.

#### **3.5.1.2.6 Análisis de la sensibilidad de la técnica**

Sensibilidad de la técnica en PCR es la mínima cantidad de ADN que se puede detectar y que se requiere para obtener una gran cantidad de copias. La técnica es más sensible cuanto menor es la cantidad inicial de ADN que hay que suministrar para obtener una buena amplificación de la misma. En la Figura 3.5 se muestra el diagrama seguido en la metodología para determinar la sensibilidad de la técnica utilizada para la identificación de *E. faecalis*.

Procedimiento:

1. Tomar una muestra (aprox. 200  $\mu$ L) de cepa de *E. faecalis* incubada por 24 horas a 37 °C.
2. Agregar la cepa al medio BHI (aprox. 800  $\mu$ L).
3. Colocar 200  $\mu$ L de medio BHI en uno de los pozos de una microplaca y tomar lectura de absorbancia en el espectrofotómetro (lector de microplaca), usar este valor como blanco. (Ajustar longitud de onda a 450 nm en el equipo).
4. Tomar 200  $\mu$ L de la mezcla y colocarlos en uno de los pozos de la microplaca, tomar lectura de absorbancia en el lector de microplaca, restar el valor de la lectura al valor del blanco.
5. Agregar medio BHI o medio con cepa a la mezcla y repetir lectura hasta ajustar la absorbancia a 0.12.
6. Una vez lograda la lectura de absorbancia a 0.12 en el equipo, tomar esta mezcla como referencia.
7. Tomar 7 tubos eppendorf de 1.5  $\mu$ L y colocar 900  $\mu$ L de medio BHI en cada uno de ellos.
8. Realizar diluciones seriadas tomando 100  $\mu$ L de la mezcla de referencia y agregarlos a uno de los tubos con BHI, agitar vigorosamente el tubo para homogenizar la mezcla.
9. Tomar 100  $\mu$ L de este tubo y agregarlos al siguiente, repetir agitación.
10. Repetir 9 hasta completar los 7 tubos.
11. Someter la muestra a 95 °C por 10 minutos para desactivar su crecimiento.
12. Someter la muestra a -20 °C para terminar de desactivar crecimiento.
13. Realizar PCR.

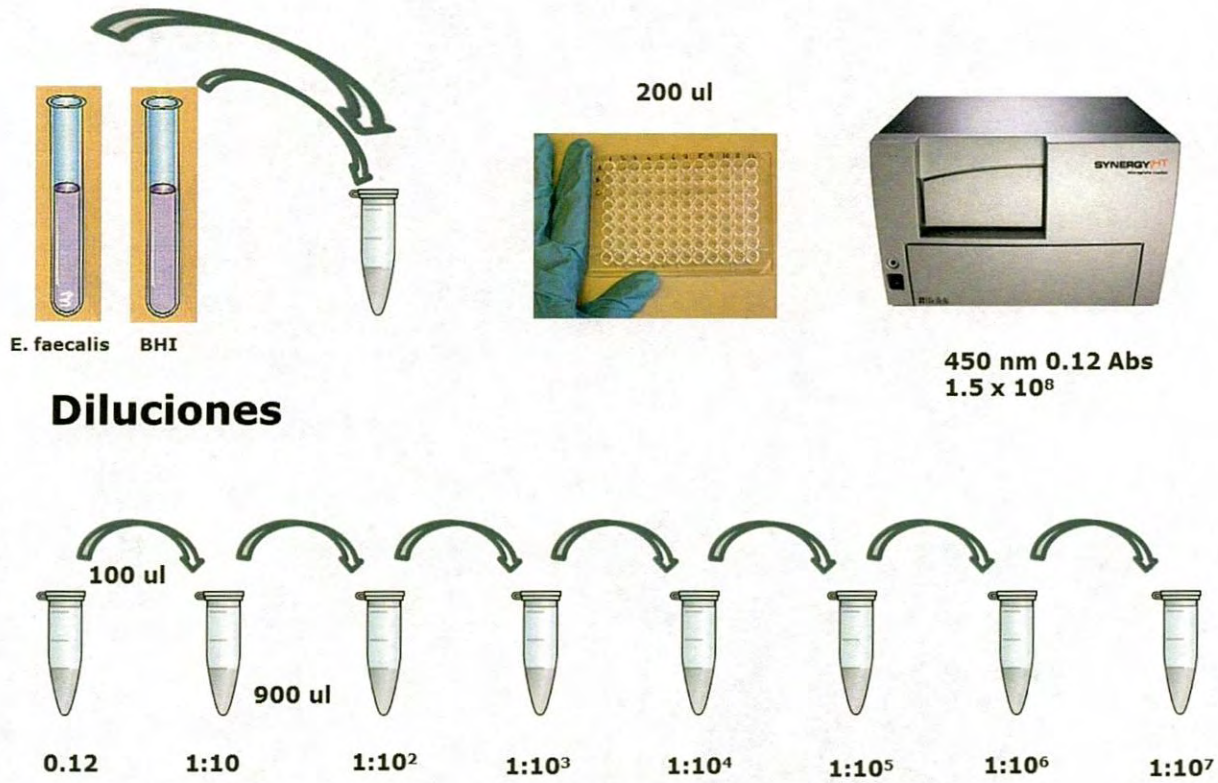


Figura 3.5. Diagrama que muestra el procedimiento para determinar la sensibilidad de la técnica para identificar *E. faecalis* por PCR tiempo real.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Caracterización de Partículas

##### 4.1.1 Concentración de partículas PM<sub>10</sub> y PST

Comparando los valores de concentración de PM<sub>10</sub> encontrados en cada una de las fechas muestreadas con los valores de concentración máxima permitida establecidos por la Norma Oficial Mexicana la cual es de 120 µg/m<sup>3</sup>, solo la estación Sur excedió la concentración máxima permitida durante el segundo Periodo de muestreo, en una sola ocasión, con un valor de 139.71 µg/m<sup>3</sup>. Los valores de PST obtenidos en todas las fechas de muestreo fueron por debajo del valor de 210 µg/m<sup>3</sup> establecido por la Norma Oficial Mexicana. En la Figura 4.1 se observan las gráficas con la concentración de partículas determinada y el valor máximo permitido por la NOM. Los resultados de los valores de concentración de PST en este estudio, contrastan con lo publicado por Cruz y col. 2013, donde reportan una calidad del aire entre no satisfactoria y mala para la ciudad de Hermosillo durante el Periodo de estudio (Junio de 2001 a Mayo de 2002), ya que las concentraciones de PST en las estaciones Centro y Noroeste rebasaron frecuentemente el máximo permisible para 24 horas (260 µg/m<sup>3</sup>), mientras que en los tres sitios de monitoreo se rebasó el máximo permisible anual (75 µg/m<sup>3</sup>), ambos valores establecidos en la Norma NOM-024-SSA1-1993 (Ssa, 1994) vigente al momento del estudio.

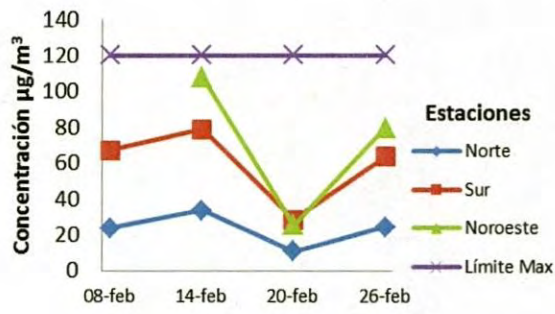
La concentración de partículas atmosféricas se analizó en cuatro lugares diferentes de la ciudad de Hermosillo, México. Los niveles de concentración por encima de las Normas Oficiales de México, se observaron sólo durante Mayo, en la estación Sur. Los resultados indican que Hermosillo, por lo menos en 2011, no presentó mayores problemas de contaminación de partículas en las zonas muestreadas.



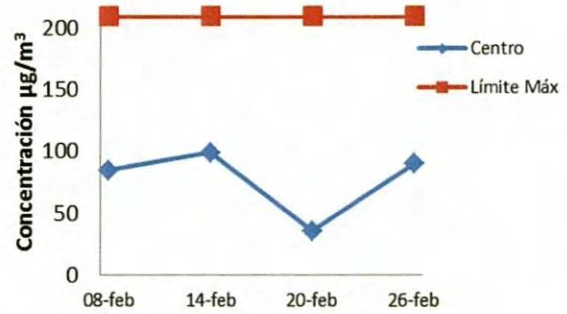
#### 4.1.2 Microscopía de barrido electrónico

Se captaron micrografías de diversos micrositios de las muestras tomadas de los filtros con partículas  $PM_{10}$  y PST. Se tomaron micrografías de muestras de filtro virgen, esto es, sin usar, para tomarlos como blanco y así poder notar la diferencia de la existencia de la diversidad de partículas capturadas en los filtros muestreados por los equipos. Las Figuras 4.2 a) y b) muestran las micrografías de filtro blanco a 50 y 10  $\mu m$  respectivamente, donde se pueden observar únicamente las microfibras limpias de cuarzo que conforman el filtro para partículas  $PM_{10}$ .

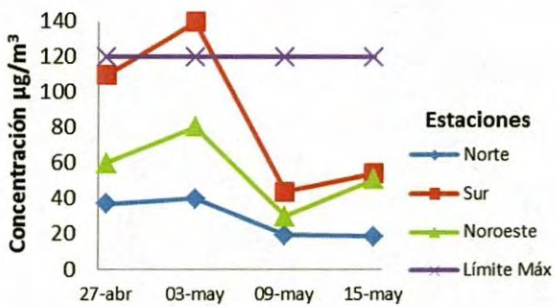
Las Figuras 4.3 a), b), c), d), e) y f) exponen micrografías de muestras de filtros con partículas  $PM_{10}$  a diferentes aumentos del microscopio. En estas se pueden apreciar la variedad de formas y tamaños de partículas entre las que se puede observar partículas aisladas, así como aglomerados de las mismas, cristales de sales y algunas diversas formas que probablemente pudiera tratarse de pólenes, esporas o microorganismos como cocos y bacilos.



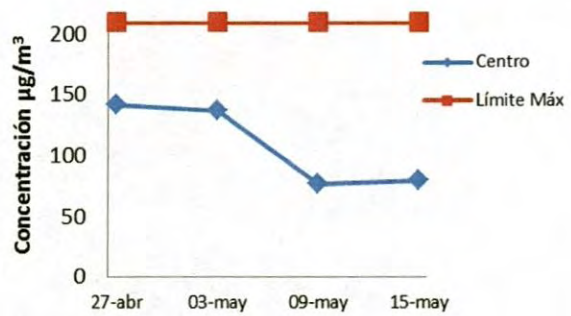
a)



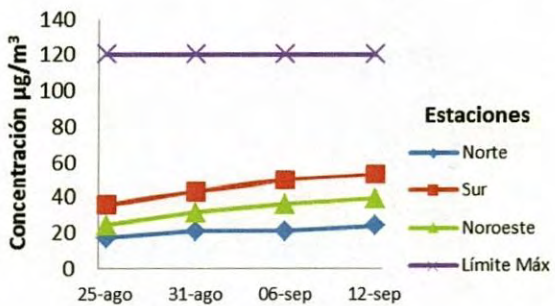
d)



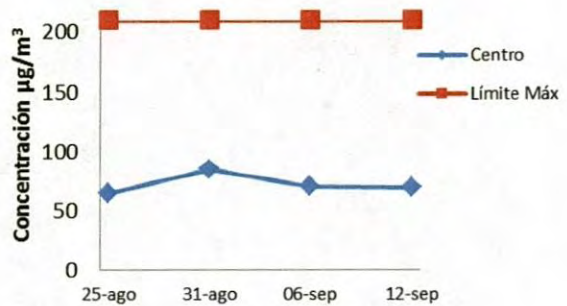
b)



e)



c)



f)

Figura 4.1. Concentración de PM<sub>10</sub> a) Primer muestreo, b) Segundo muestreo, c) Tercer muestreo y PST d) Primer muestreo, e) Segundo muestreo, f) Tercer muestreo; en los diferentes sitios.

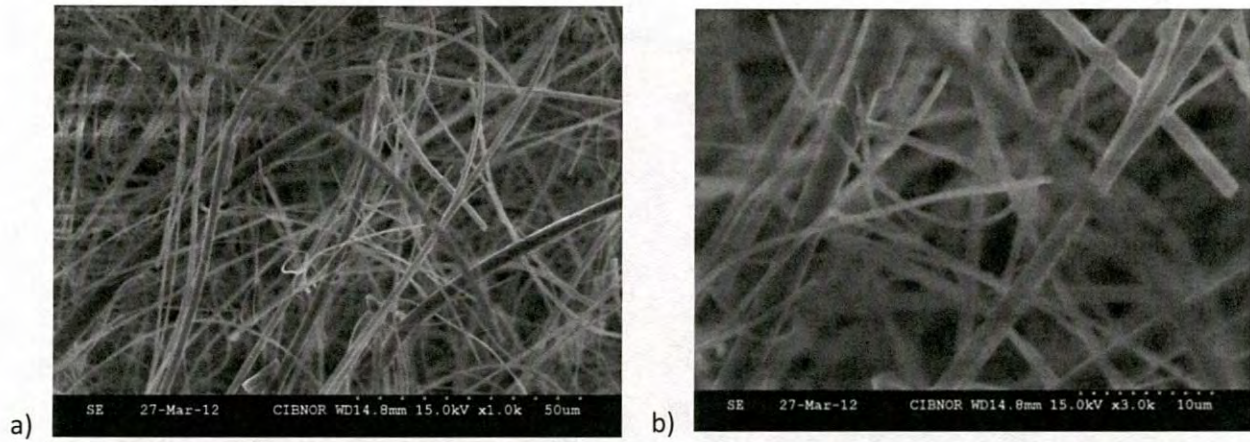
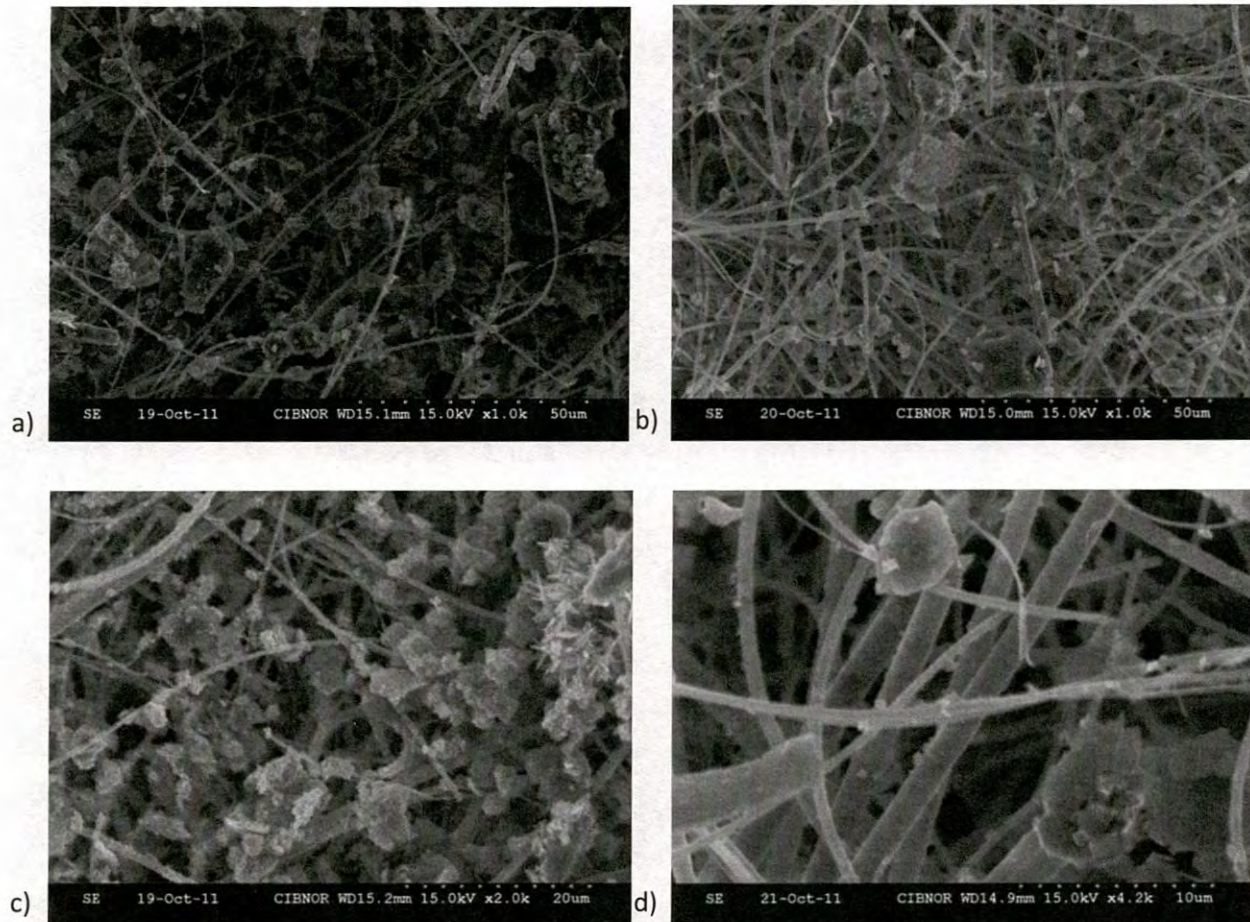
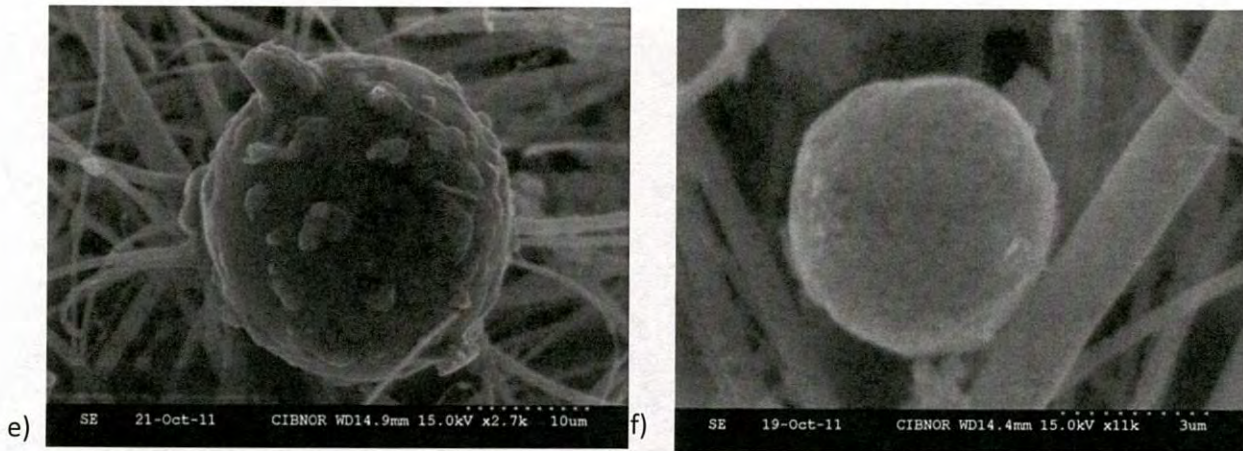


Figura 4.2 a) y b) Micrografías de filtro blanco virgen a 50 y 10  $\mu\text{m}$ , respectivamente.





Figuras 4.3 a), b), c), d), e) y f) Micrografías de filtros con partículas  $PM_{10}$  a diversos aumentos del microscopio.

Las Figuras 4.4 a) y b) muestran las micrografías de filtro blanco a 50 y 10  $\mu m$  respectivamente, donde se pueden observar únicamente las microfibras limpias de vidrio que conforman el filtro para partículas PST.

Las Figuras 4.5 a), b), c), d), e) y f) muestran micrografías de muestras de filtros con partículas PST a diferentes aumentos del microscopio. Al igual que en las micrografías de partículas  $PM_{10}$ , en éstas se pueden apreciar la variedad de formas y tamaños de partículas entre las que se puede observar partículas aisladas, así como aglomerados de las mismas, cristales de sales y algunas diversas formas que probablemente pudiera tratarse de pólenes, esporas o microorganismos como cocos y bacilos.

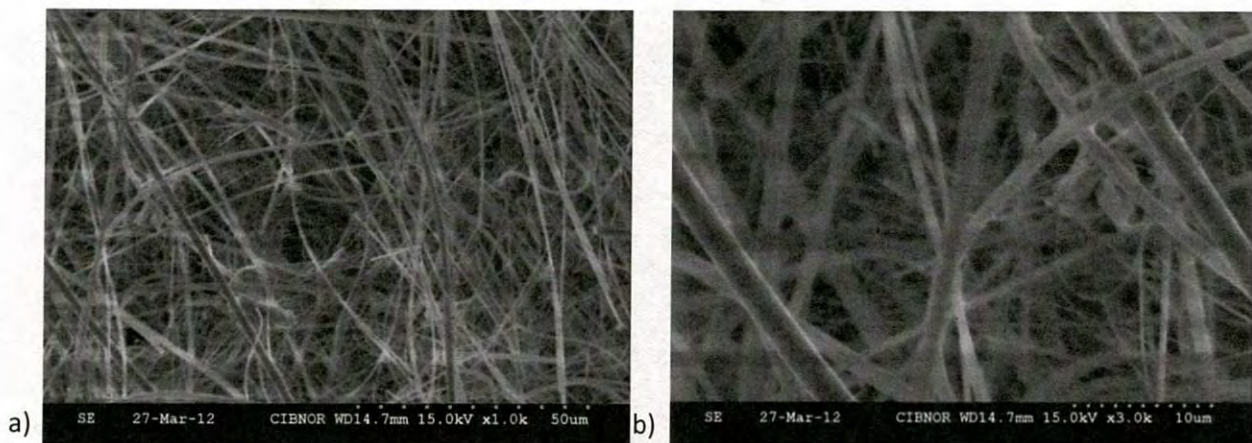
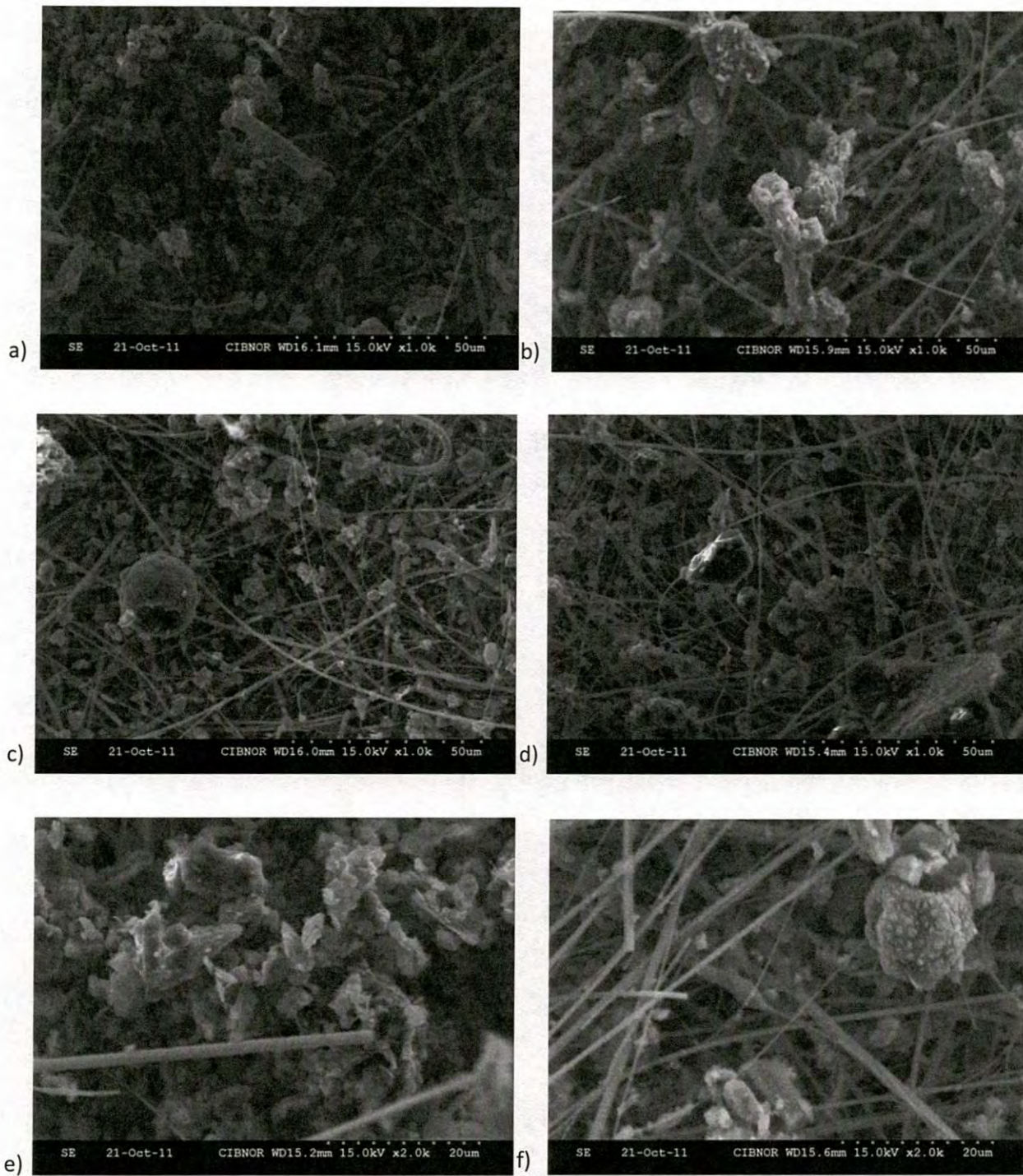


Figura 4.4 a) y b) Micrografías de filtro blanco virgen a 50 y 10  $\mu m$ , respectivamente.



Figuras 4.5 a), b), c), d), e) y f) Micrografías de filtro con partículas PST a diversos aumentos del microscopio.

#### 4.1.3 Espectroscopia de energía de dispersión de rayos X.

Se tomaron cuatro muestras de cada uno de los filtros para su análisis químico, por lo que se manejó un total de 192 muestras, de estas se eligieron 3 micrositios para realizar el microanálisis. De los valores de

porcentajes en peso obtenidos de los elementos químicos detectados, se determinó un promedio para las muestras de cada filtro. Estos valores fueron extrapolados al tamaño real del filtro, obteniéndose valores de peso en microgramos. Utilizando el volumen de aire muestreado, determinado a partir del flujo de aire registrado y el tiempo de operación del equipo de muestreo, se determinó la concentración en microgramos por metro cúbico de cada uno de los elementos químicos detectados en el microanálisis. En el Anexo I se puede encontrar la Tabla 1 que muestra la concentración de los elementos detectados en los filtros PM<sub>10</sub> y en la Tabla 2 la de PST.

La Tabla 4.1 muestra los números que identifican los filtros utilizados por los equipos muestreadores en cada una de las fechas y estaciones de muestreo, las cuales cubren los tres Periodos.

**Tabla 4.1. Periodos de muestreo**

	PERIODOS DE MUESTREO											
	Primer Periodo				Segundo Periodo				Tercer Periodo			
Estación	08 feb	14 feb	20 feb	26 feb	27 abr	02 may	09 may	15 may	25 ago	31 ago	06 sep	12 sep
Sur	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41	45
Centro	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46
Norte	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39	43	47
Noroeste	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48

Los elementos detectados en el microanálisis de las muestras de PM<sub>10</sub> fueron magnesio (Mg), aluminio (Al), fósforo (P), azufre (S), cloro (Cl), potasio (K), calcio (Ca), fierro (Fe) y estroncio (Sr). Algunos de estos elementos se encuentran en forma de compuestos en el medio ambiente, pero el sistema de microanálisis por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X los detecta y los reporta como elementos puros.

La Figura 4.6 presenta la gráfica con las concentraciones de los elementos químicos encontrados en los filtros de la estación de muestreo ubicada en el Sur de la ciudad. En ésta se muestra la concentración de los elementos, en microgramos por metro cúbico, registrados en cada una de las fechas de muestreo, durante los tres Periodos muestreados.

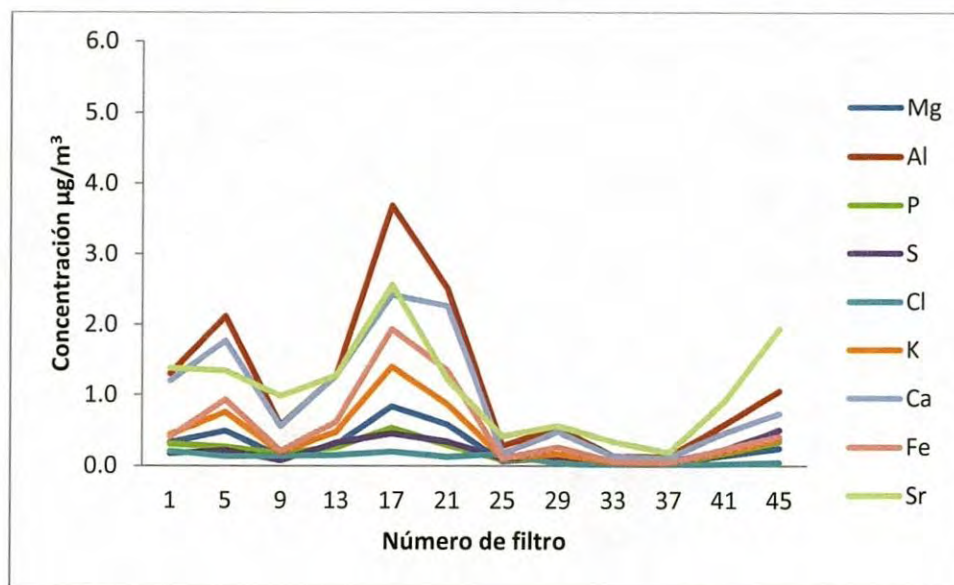


Figura 4.6 Concentración de elementos químicos en la estación Sur.

Como se puede observar en el gráfico, los valores de concentración más altos corresponden a los elementos Al, Sr y Ca. La concentración de aluminio para esta estación osciló en un intervalo de 0.13 a 3.70  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , encontrándose el valor más alto en el filtro con número 17 correspondiente al 27 de Abril y el valor más bajo en el filtro 37 correspondiente al 31 de Agosto. La concentración de estroncio osciló en un intervalo de 0.19 a 2.57  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , siendo también el filtro número 17 donde se encontró el valor más alto y en el 37 el valor más bajo. De la misma manera fueron los filtros 17 y 37 en donde se registró el valor mayor y menor de concentración de calcio. Aunque estos elementos fueron los que registraron mayores valores de concentración, el comportamiento para los demás fue muy similar, registrándose los valores más altos y más bajos en los filtros 17 y 37 respectivamente.

La Figura 4.7 presenta la gráfica con las concentraciones de los elementos químicos encontrados en los filtros de la estación de muestreo ubicada en el Norte de la ciudad. De la misma manera que en la estación Sur, se muestra la concentración de los elementos, en microgramos por metro cúbico, registrados en cada una de las fechas de muestreo, durante los tres Periodos muestreados.

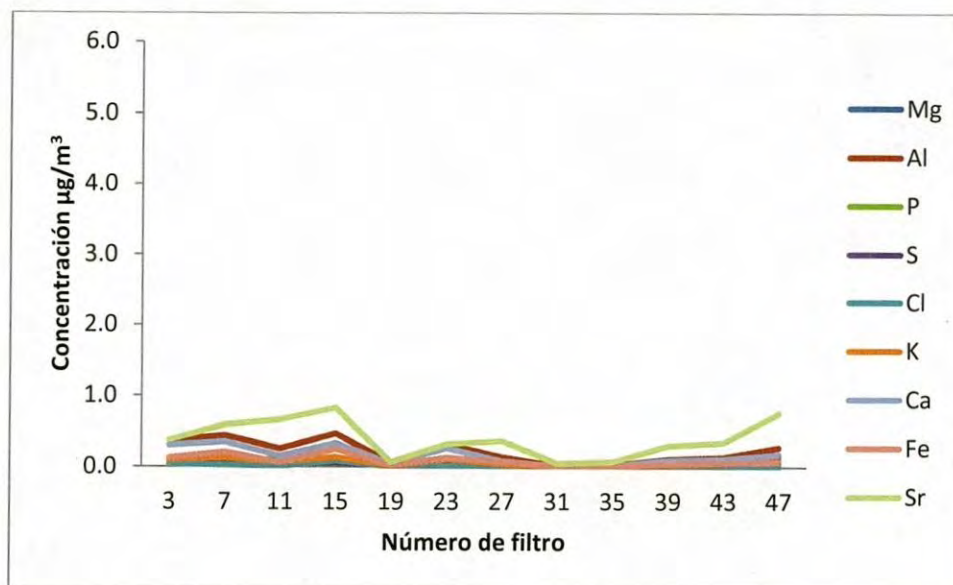


Figura 4.7 Concentración de elementos químicos en la estación Norte.

Se puede apreciar en la gráfica que los elementos con valores más altos corresponden al estroncio, aluminio y calcio. La concentración de estroncio para ésta estación osciló en un intervalo de 0.05 a 0.83  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , encontrándose el valor más alto en el filtro con número 15 correspondiente al 26 de Febrero y el valor más bajo en el filtro 31 correspondiente al 15 de Mayo. La concentración de aluminio osciló en un intervalo de 0.02 a 0.46  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , siendo también el filtro número 15 donde se encontró el valor más alto y el 31 el valor más bajo. El valor de concentración de calcio osciló en un intervalo de 0.01 a 0.35  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , encontrándose el valor más alto en el filtro con número 7 correspondiente al 14 de Febrero y el valor más bajo en el filtro 31 correspondiente al 15 de Mayo. Muy similar se muestra la tendencia de los demás elementos en esta estación de muestreo.

La Figura 4.8 presenta la gráfica con las concentraciones de los elementos químicos encontrados en los filtros de la estación de muestreo ubicada en el Noroeste de la ciudad.



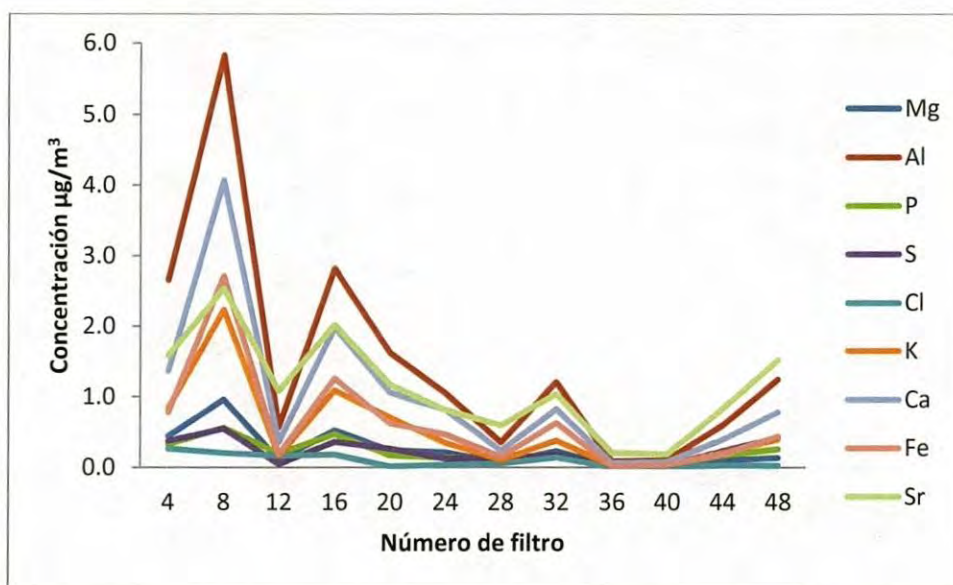


Figura 4.8 Concentración de elementos químicos en la estación Noroeste.

Como se puede observar en la gráfica los valores de concentración más altos corresponden al aluminio, calcio y estroncio. La concentración de aluminio para ésta estación osciló en un intervalo de 0.09 a 5.83  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , encontrándose el valor más alto en el filtro número 8 correspondiente al 14 de Febrero y el valor más bajo en el filtro 36 correspondiente al 25 de Agosto. La concentración de calcio osciló en un intervalo de 0.07 a 4.07  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , también en el filtro número 8 donde se encontró el valor más alto y el 36 el valor más bajo. De la misma manera fueron los filtros 8 donde se registró el valor mayor de concentración de estroncio y el menor en el filtro número 40 correspondiente al 31 de Agosto. Muy similar se muestra el comportamiento de los demás elementos en esta estación de muestreo.

Los elementos detectados en el microanálisis de las muestras de  $\text{PM}_{10}$  coinciden con lo reportado por Ramírez y col. (2007), a excepción del Sr que ellos no lo reportan, sin embargo ellos reportan Cr, Na, Si, Ti, Zn, Pb, Ce, Ni, U, V y Zr, esta diferencia estriba en que en nuestro estudio no se reportaron los elementos traza debido a que los porcentajes en peso de cada elemento presentados fueron muy bajos. Otro de los elementos que Ramírez y col. reportan es el Silicio, el cual es parte de la matriz del material con el cual están compuestas las microfibras del filtro. En este estudio se analizaron varias muestras de filtro virgen, sin material particulado, y los valores obtenidos en porcentaje en peso de Silicio se le restaron a los valores obtenidos en las muestras con partículas, valores que fueron semejantes en ambas muestras. Lo que es probable que Ramírez y col. reportaran el silicio como componente de las partículas atmosféricas muestreadas. También reportan como elementos químicos altamente relevantes debido a su impacto

potencial en la salud pública al Bi, Cr, Pb, S y U por su tamaño menor a  $10\ \mu\text{m}$  ya que poseen la capacidad de ingresar más profundamente en el sistema respiratorio y penetrar en otros tejidos y sistemas del cuerpo (Ramirez y col., 2007). A excepción del azufre, estos elementos no se están incluyendo en este estudio por haberse detectado como elementos traza.

Los elementos detectados en el microanálisis de las muestras de PST fueron carbono (C), magnesio (Mg), aluminio (Al), azufre (S), cloro (Cl), calcio (Ca), fierro (Fe) y titanio (Ti).

La Figura 4.9 presenta la gráfica con las concentraciones de los elementos químicos encontrados en los filtros de la estación de muestreo ubicada en el Centro de la ciudad.

Como se puede apreciar en la gráfica, el elemento que mayor concentración presentó fue el carbono con un valor máximo de  $26.25\ \mu\text{g}/\text{m}^3$  en el filtro número 2 correspondiente al 8 de Febrero y con una mínima nula el 31 de Agosto. Esta estación de muestreo fue en la única que detectó carbono y para efectos de comparación de los valores de concentración de los elementos con las demás estaciones, se descarta la línea que lo representa y así poder utilizar la misma escala de concentración.

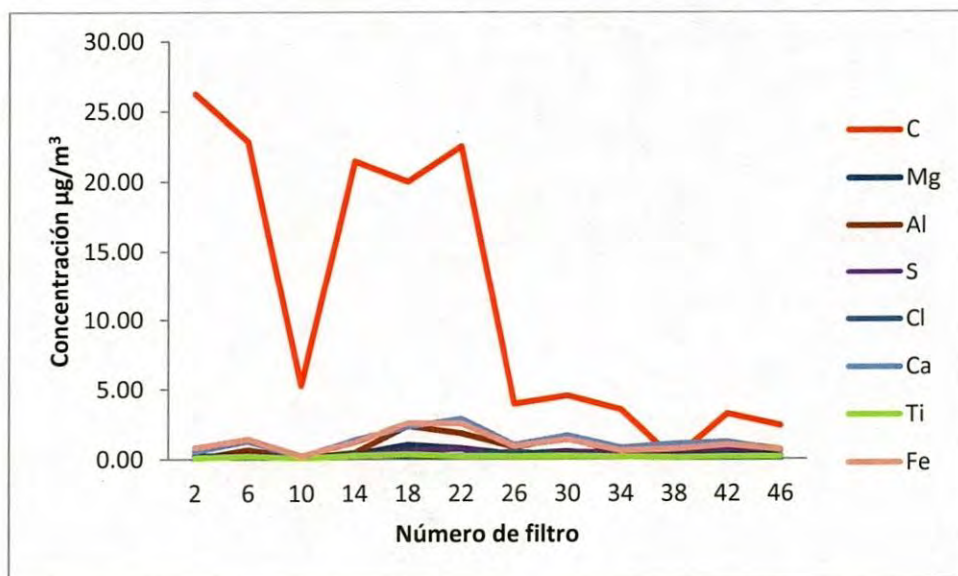


Figura 4.9 Concentración de elementos químicos en la estación Centro.

La Figura 4.10 presenta la misma gráfica 4.9 pero sin presentar la línea del carbono. En esta se puede apreciar que los elementos que presentan mayores valores de concentración son el calcio, fierro y aluminio. Estos valores en el calcio oscilan en el intervalo de  $0.17$  a  $2.88\ \mu\text{g}/\text{m}^3$  correspondientes al 20 de

Febrero el valor mínimo y al 2 de Mayo, el valor máximo. Los valores de concentración del fierro oscilan en el intervalo de 0.23 a 2.56  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  que corresponden a las fechas del 20 de Febrero para el mínimo y 27 de Abril para el máximo. La máxima concentración de aluminio se presentó el 27 de Abril con un valor de 2.35  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  y una mínima de cero el 8 de Febrero. Los demás elementos difieren en la tendencia con el calcio, fierro y aluminio.

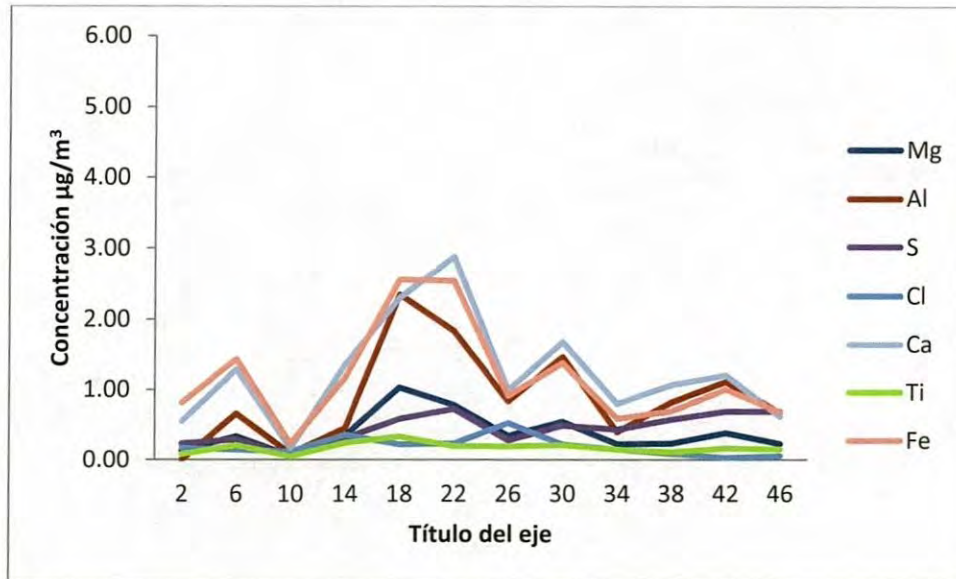


Figura 4.10 Concentración de elementos químicos en la estación Centro.

Los elementos químicos encontrados en las muestras de los filtros de PST coinciden con lo reportado por Ramírez y col. y difiere con los elementos Ba, Br, Ce, Cr, Cu, K, Si y Zr, esta diferencia estriba en que en este estudio no se reportaron los elementos traza debido a que los porcentajes presentados fueron muy bajos. Otro de los elementos que Ramírez y col. reportan es el silicio, el cual es parte de la matriz del material con el cual están compuestas las microfibras del filtro. En este estudio se analizaron varias muestras de filtro virgen, sin material particulado y los valores de masa obtenidos de Si se le restaron a los valores de masa obtenidos en las muestras con partículas, valores que fueron muy semejantes en ambas muestras.

Los resultados reportados por Ramírez en la caracterización de las partículas PST y  $\text{PM}_{10}$ , muestran que los elementos más abundantes son, en gran medida, el Al, Si, Ca, Fe, K, Mg y son por lo general relacionados con fuentes provenientes de actividades como la agricultura, áreas de suelo libres de impacto antropogénico, calles y sitios de construcción pavimentada. Mientras que elementos como el cloro se asocian más frecuentemente con actividades de incineración y combustión, así como derivados

de los aerosoles marinos. Otros elementos químicos, tales como Ba, Bi, Br, Cu, Cr, Mn, Na, Ni, P, Pb, Ti y Zn son más comúnmente relacionados con actividades humanas e industriales. Elementos como el V y S son indicadores del nivel de carburante de la combustión, así como del abastecimiento regional de sulfatos (Ramírez y col., 2007).

#### **4.1.4 Distribución del tamaño de partículas de PM<sub>10</sub> y PST.**

##### **4.1.4.1 Estación Sur**

Los resultados de la distribución de tamaño de partículas se lograron con la ayuda de los programas Piximetre y SigmaPlot, de los cuales se obtuvieron gráficas con histogramas que muestran la frecuencia de los diferentes intervalos de medidas de partículas. Las Figuras 4.11 a), b) y c) muestran la frecuencia y la cantidad de partículas de los diferentes tamaños de PM<sub>10</sub> para los tres Periodos de muestreo en la estación Sur. En estas gráficas se puede observar que, las primeras barras, que corresponden a las partículas más finas (que oscilan en el intervalo de 0.27 a 2.23  $\mu\text{m}$ ), presentan el mayor número de partículas en este intervalo y estas se presentan en el primer Periodo de muestreo (que comprende del 8 al 26 de Febrero), esto representa el 62.86 % de las partículas contadas. Para el segundo Periodo de muestreo (del 27 de Abril al 15 de Mayo) las partículas más finas, las cuales oscilan en el intervalo de 0.37 a 2.29  $\mu\text{m}$  representan el 54.44 % de las partículas contabilizadas y para el tercer Periodo (del 25 de Agosto al 12 de Septiembre) las partículas más finas oscilan en el intervalo de 0.44 a 2.35  $\mu\text{m}$ , lo cual representa el 61.4 % de las partículas contadas.

##### **4.1.4.2 Estación Norte**

Las Figuras 4.12 a), b) y c) muestran la frecuencia y la cantidad de partículas de los diferentes tamaños de partículas PM<sub>10</sub> para los tres Periodos de muestreo en la estación Norte. En estas se puede apreciar que el mayor número de partículas finas las cuales oscilan en el intervalo de 0.27 a 2.23  $\mu\text{m}$  se presentan durante el primer Periodo de muestreo, éste número representa el 64.56 % de las partículas contabilizadas coincidiendo con los datos que se reportan para la estación Sur. En el Periodo 2, las partículas finas oscilan en el intervalo de 0.37 a 2.29  $\mu\text{m}$  las cuales representan el 58.64 % del total de partículas y en el Periodo 3 el intervalo de partículas finas oscila entre 0.44 y 2.35  $\mu\text{m}$  las cuales representan el 63.41 % del total de partículas.

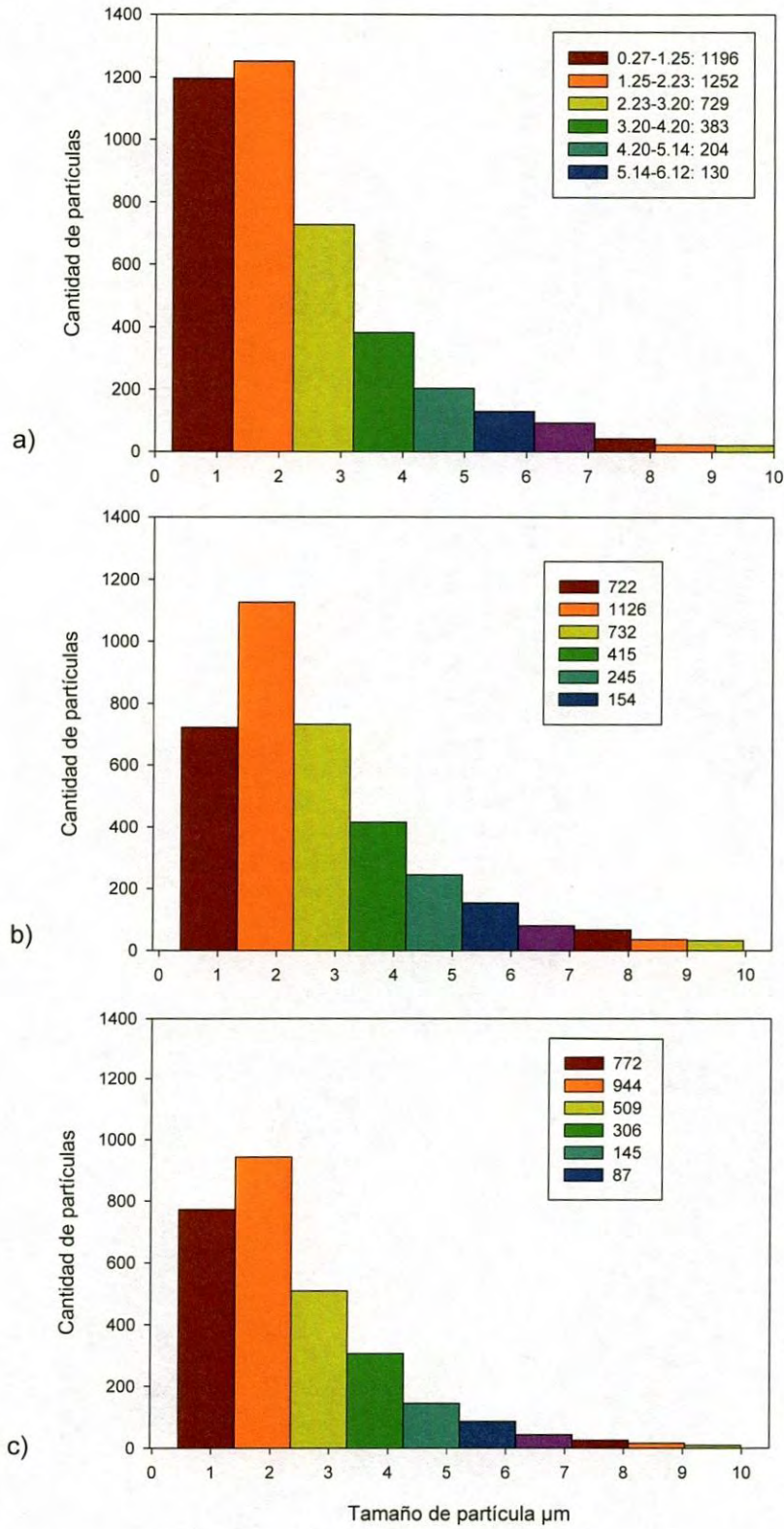


Figura 4.11 Distribución de tamaño de partículas PM<sub>10</sub> de la Estación Sur, a) Periodo 1, b) Periodo 2 y c) Periodo 3.

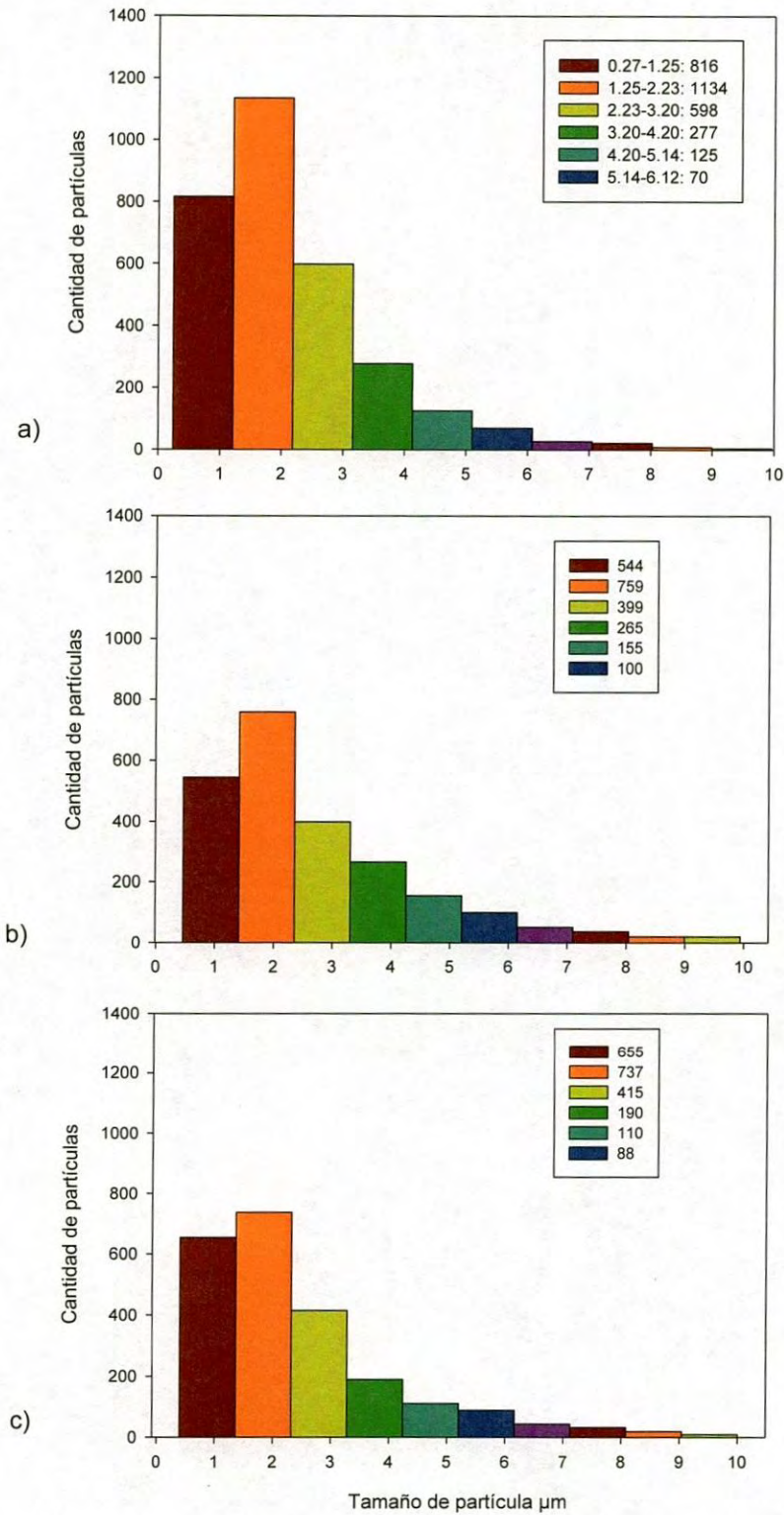


Figura 4.12 Distribución de tamaño de partículas PM<sub>10</sub> de la estación Norte, a) Periodo 1, b) Periodo 2 y c) Periodo 3.

#### **4.1.4.3 Estación Noroeste**

Las Figuras 4.13 a), b) y c) muestran la frecuencia y la cantidad de partículas de los diferentes tamaños de  $PM_{10}$  para los tres Periodos de muestreo en la estación Norte. En estas se puede observar que la mayor cantidad de partículas finas, las cuales oscilan en el intervalo de 0.27 a 2.23  $\mu m$  para el primer Periodo, representan el 47.07 % de las partículas contadas, para el segundo Periodo éstas oscilan en el intervalo de 0.37 a 2.29  $\mu m$  y representan el 50.34 % del total de partículas y para el tercer Periodo, oscilan entre 0.44 y 2.35  $\mu m$  las cuales representan el 63.41 % de las partículas contabilizadas.

#### **4.1.4.4 Estación Centro**

Las Figuras 4.14 a), b) y c) muestran la frecuencia y la cantidad de partículas de los diferentes tamaños de PST durante los tres Periodos de muestreo en la estación Centro. En estas se puede apreciar que la mayor cantidad de partículas finas, las cuales oscilan en un intervalo de 0.46 a 2.35  $\mu m$ , representan el 68.13 % del total de partículas durante el primer Periodo, el 59.77 % para el segundo y el 59.52 % para el tercer Periodo.

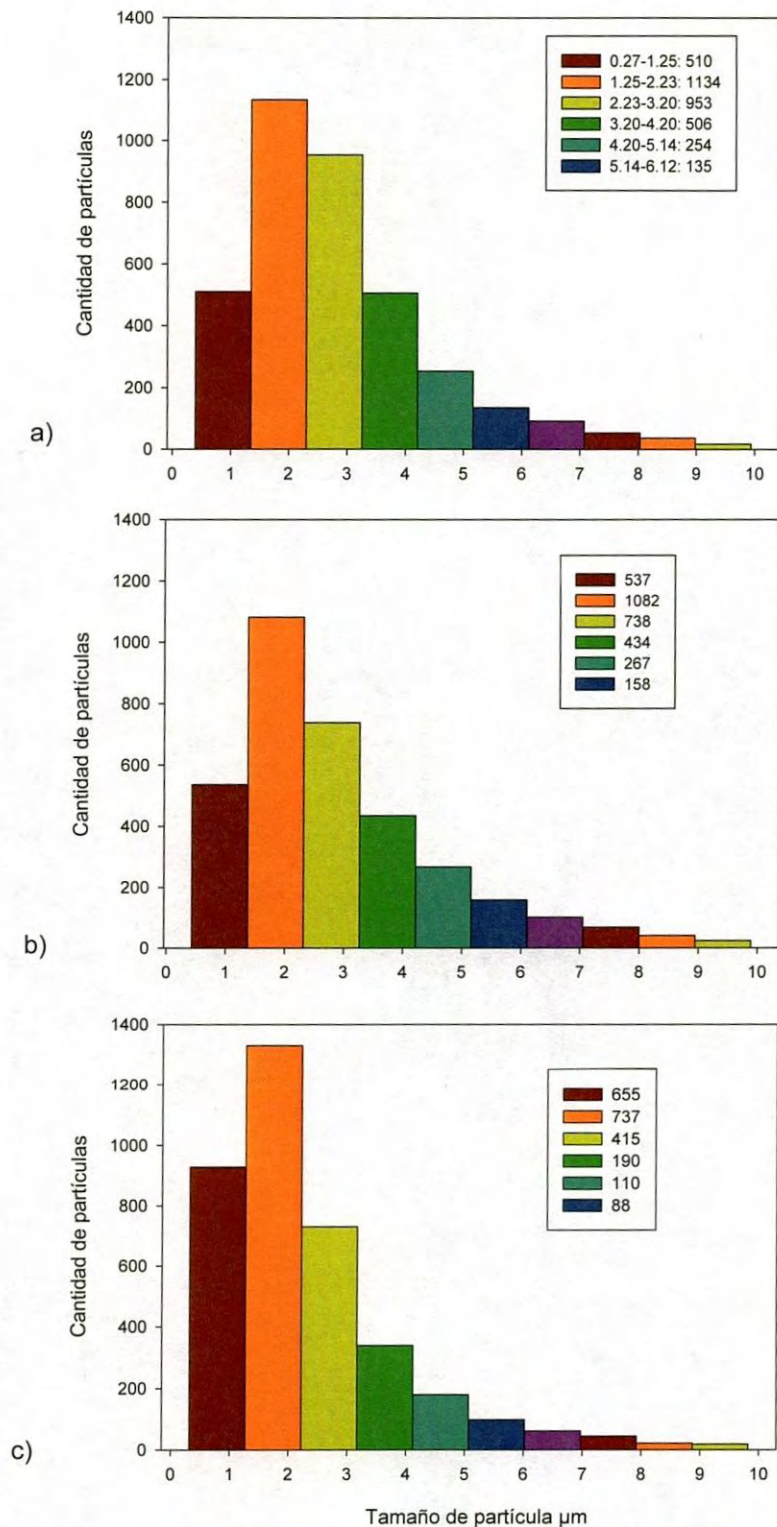


Figura 4.13 Distribución de tamaño de partículas PM<sub>10</sub> de la Estación Noroeste, a) Periodo 1, b) Periodo 2 y c) Periodo 3.



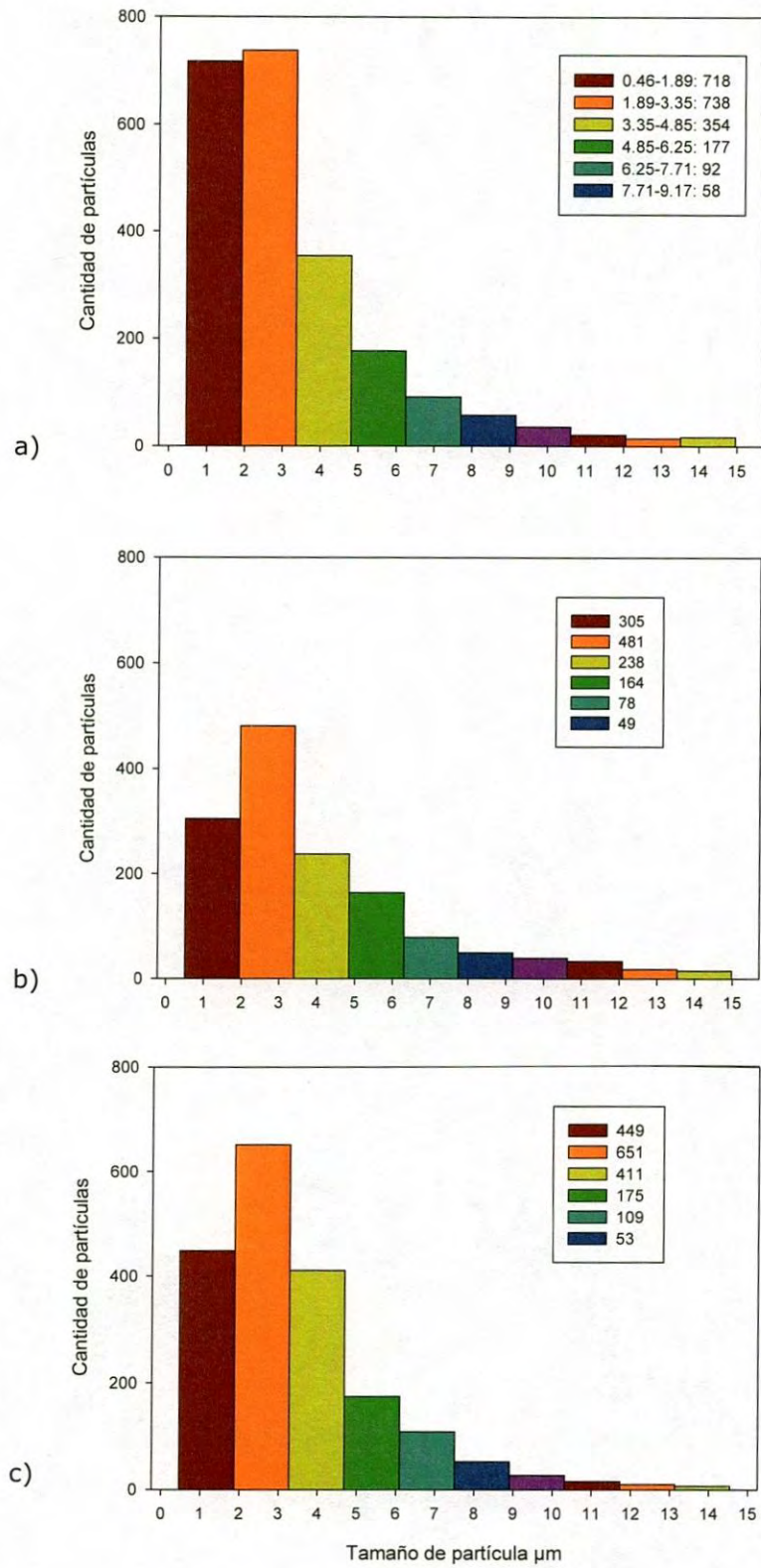


Figura 4.14 Distribución de tamaño de partículas PST de la Estación Centro, a) Periodo 1, b) Periodo 2 y c) Periodo 3.

Estos porcentajes de las partículas más finas contabilizadas son de suma importancia debido a que en promedio aproximadamente el 60 % de éstas, las cuales son menores a 2.5  $\mu\text{m}$ , son las que penetran en la fracción respirable y pueden llegar al espacio alveolar del pulmón. Las partículas menores a 3 micrómetros llegan en gran cantidad a los alvéolos. Las partículas que penetran al epitelio alveolar inician un proceso de inflamación pulmonar, se presentan igualmente cambios inflamatorios sistémicos afectando la coagulación de la sangre, lo cual puede obstruir los vasos sanguíneos, provocando angina o hasta infarto al miocardio (México, 2011). La exposición a las partículas atmosféricas representa un riesgo de salud significativo en los principales centros urbanos. Las propiedades químicas y físicas y los mecanismos toxicológicos por los cuales las partículas ocasionan efectos adversos para la salud son todavía inciertos. El tamaño aerodinámico de las partículas finas se ha convertido en un factor relevante por su toxicidad debido a su capacidad para penetrar en el sistema respiratorio; es decir, las partículas finas alcanzan las regiones más profundas de los pulmones, mientras que las partículas gruesas pueden depositarse en las regiones superiores de las vías respiratorias. Los componentes químicos median la respuesta tóxica y por lo tanto podrían ser relevantes en la inducción de efectos adversos para la salud en los seres humanos. Vizcaya y col. sugieren que debido al alto contenido de metales en las partículas atmosféricas encontrado en un estudio en la ciudad de México en el 2002, éstas podrían desempeñar un papel importante en daño celular. La toxicidad potencial de las partículas finas, se puede deber a su contenido de compuestos orgánicos, metales y a otras especies reactivas químicas. Algunos autores han reportado estudios *in vitro* en células pulmonares humanas y macrófagos murinos, que fueron expuestos a las partículas de las regiones del Norte y Centro de la ciudad de México, los cuales mostraron efectos tóxicos más altos que los de la región Sur (citotoxicidad, la rotura del ADN y la muerte celular por apoptosis) (Vizcaya y col., 2006).

## **4.2 Análisis Microbiológico por Pruebas Bioquímicas**

### **4.2.1 Toma de muestras**

De los tres Periodos de muestreo, se consideró realizar el análisis de las muestras de los filtros, mediante la aplicación de pruebas bioquímicas, los días primero y último de cada uno de los Periodos, se tomaron 4 muestras de cada uno de los filtros muestreados, por lo que se aplicaron las diversas pruebas bioquímicas a un total de 96 muestras.

#### 4.2.2 Análisis microbiológico

Los resultados del análisis microbiológico, utilizando técnicas tradicionales, revelaron la presencia de microorganismos asociados con enfermedades respiratorias, tales como *Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae* y *Citrobacter sp 10*, principalmente, así como *Enterococcus faecalis* y del género *Pseudomonas* y *Enterobacterias*.

En la estación de muestreo Sur y Noroeste, se encontró *E. faecalis* en el 50 % de las muestras, 100 % en la estación Centro y 33 % en la estación Norte. En el Centro y en el Norte se encontró *Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae* el 8 de Febrero. *Citrobacter sp 10* se encontró en una ocasión en el Sur y en el Noroeste, cada una en fechas diferentes. *Butiauxella agrestis* y *Proteus penneri* se encontró sólo en la estación Sur. El 15 de Mayo, se encontró *Salmonella paratyphi A* y *Enterobacter Sacazakii* en la estación Noroeste. La Tabla 4.2 muestra los microorganismos encontrados en el análisis y la Figura 4.15 los resultados de UFC por unidad de filtro en cada estación y Periodo de muestreo analizados, así como su distribución por zona muestreada. Aquí se puede observar que la mayor cantidad de UFC se encontraron en el primer Periodo de muestreo, correspondiente al mes de Febrero (Invierno) y la menor en Septiembre (Verano), contrario a lo reportado por Grisoli y col. (2009), donde reporta la influencia de las estaciones del año en los niveles de microorganismos en el aire, donde la contaminación microbiana fue, en promedio, más alta en Verano que en Invierno (Grisoli y col., 2009).

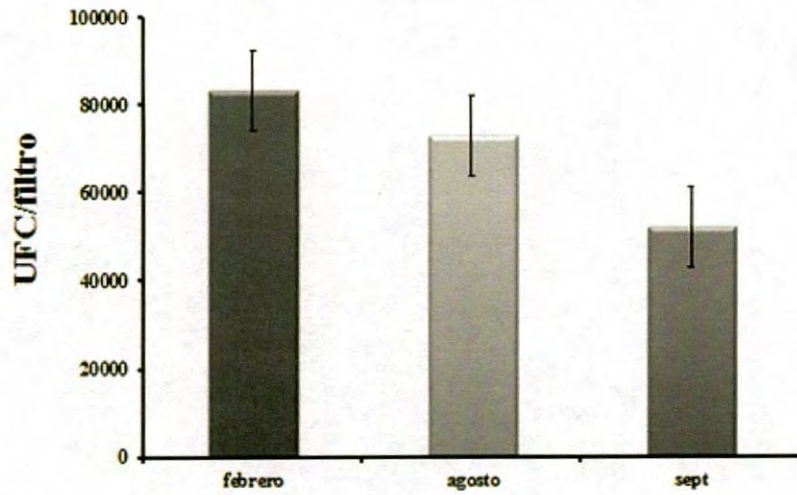
Debido a que *E. faecalis* fue el microorganismo con mayor número de apariciones en el estudio, un análisis de sensibilidad a los antibióticos se realizó con el apoyo de un laboratorio local (Laboratorios Acuña, Hermosillo, México). Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 4.3. Un dato interesante de estos resultados es que se encontraron dos cepas (1 y 2) del mismo microorganismo (*E. faecalis*) con diferente respuesta a los antibióticos, donde uno presentaba resistencia y el otro sensibilidad a algunos de los antibióticos como la ampicilina, la eritromicina y la nitrofurantoina.

Aunque se considera clásicamente un comensal de los tractos gastrointestinales de los seres humanos y los animales en lugar de un patógeno humano especializado, los enterococos han llegado a ser extremadamente relevante en las infecciones adquiridas en el hospital (Ruiz y col., 2006). En los últimos años, *E. faecalis* se ha ubicado súbitamente entre los principales agentes etiológicos de bacteremias, infecciones urinarias y otros diversos padecimientos intrahospitalarios, debido a la mayor virulencia de las cepas implicadas y a la progresiva propagación de clonas multirresistentes a los antibióticos. La cantidad de cepas nosocomiales conocidas como VRE (por vancomycin-resistant *Enterococcus*) continúa

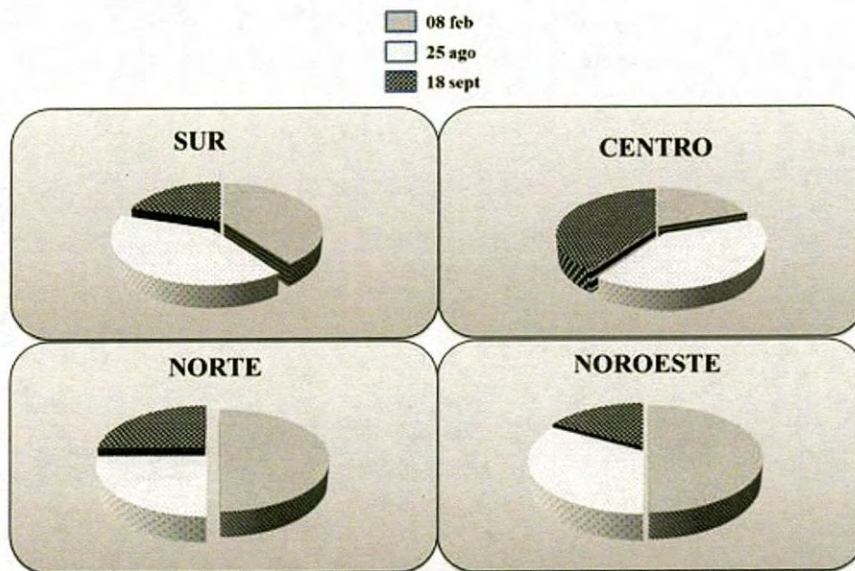
umentando progresivamente, al tiempo que provoca la inutilidad de la vancomicina, un antimicrobiano al que se le había reservado para la erradicación de microorganismos resistentes. Se estima que las infecciones intrahospitalarias ocasionadas por *enterococos* afectan anualmente a más de 800,000 pacientes estadounidenses, con costos superiores a los 500 millones de dólares, lo que sitúa a estas bacterias como el segundo agente causal de infecciones urinarias en EUA con frecuencias sólo menores a las de *Escherichia coli*, y el tercero de bacteremia apenas por debajo de *Staphylococcus aureus* y de los *Staphylococcus coagulasa negativa*; cabe destacar que más de la mitad de los casos enterocócicos de invasión sanguínea son debidos a VRE, en cuyo caso los índices de mortalidad ascienden hasta 37 %, cifra muy superior a la de 16 %, la cual se estima para los decesos provocados por cepas susceptibles a vancomicina. Entre las principales enfermedades que causa una infección por *E. faecalis* se encuentra la bacteremia, endocarditis, infecciones urinarias, contaminación de heridas postquirúrgicas y endoftalmistis (Garza y col., 2002).

**Tabla 4.2. Microorganismos identificados usando pruebas bioquímicas.**

ZONAS	8-FEB	26-FEB	27-ABR	15-MAY	25-AGOS	18-SEP
SUR	<i>Butiauxella agrestis</i>	<i>E. faecalis</i> <i>Proteus penneri</i> <i>Citrobacter sp. 10</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterobacterias</i>		<i>E. faecalis</i>
CENTRO	<i>E. faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>E. faecalis</i> <i>Cedecea sp. 3</i>	<i>E. faecalis</i> <i>Enterobacterias</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
NORTE	<i>E. faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae subpneumoniae</i>	<i>Pseudomonas</i>		<i>E. faecalis</i>		
NOROESTE	<i>Pseudomonas sp</i>		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> <i>Citrobacter sp.10</i> <i>Salmonella paratyphi A</i> <i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>E. faecalis</i>	



(a)



(b)

Figura 4.15 UFC de bacterias mesófitas obtenidas en cada estación de muestreo en tres diferentes épocas del año (a).

Distribución por zona muestreada (b).

Tabla 4.3 Prueba de sensibilidad a los antibióticos de 6 cepas de *E. faecalis*.

ANTIBIOTICO	1	2	3	4	5	6
Ampicillin	R	S	R	MR	S	S
Azithromycin	MR	MR	MR	R	S	MR
Ciprofloxacin	MR	MR	MR	R	S	MR
Clarithromycin	S	S	R	S	MR	S
Erythromycin	R	S	R	R	R	MR
Nitrofurantoin	R	S	S	S	MR	S
Fosfomicin	R	R	R	R	S	MR
Gentamicin	R	R	R	S	R	S
Llevofloxacin	S	S	MR	MR	S	MR
Norfloxacin	MR	S	S	MR	S	S
Ofloxacin	MR	MR	S	R	MR	MR
Penicillin G	R	S	S	R	S	R
Rifampicin	MR	MR	R	MR	MR	MR
Cotrimoxazole	S	MR	MR	MR	MR	MR
Tetracycline	MR	S	S	S	S	S
Vancomycin	S	S	S	S	S	S

S= Sensitivo; MR= Moderadamente Resistente; R= Resistente

La contaminación del aire ha sido ampliamente estudiada en diferentes países para identificar los riesgos potenciales de las enfermedades respiratorias en los seres humanos. Sin embargo, el foco principal de estos estudios es sobre la contaminación química del aire con respecto a la presencia de monóxido de carbono (CO), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub> y NO), la reducción de nitrógeno (amoníaco, NH<sub>3</sub>, amonio, NH<sub>4</sub>), ozono (O<sub>3</sub>) (Aceves y col., 2012; Restrepo y col., 2012), metales pesados (Spangler, 2012; Monick y col., 2013) y material particulado PM (Aceves y col., 2012; Newth y Gunasekera, 2012; Vivanco y col., 2012).

Algunos autores han estado analizando la posible transmisión de patógenos a través del aire, pero estos estudios se han dirigido a las zonas donde el alto contenido de patógenos potenciales está presente, tales como plantas de tratamiento de agua y vertederos de basura (Kalwasińska y Burkowska, 2013). Pocas investigaciones se han realizado en busca de contaminantes biológicos en el aire; el más común es la

búsqueda de partículas que causan enfermedades alérgicas como el polen (Ghosh y col., 2012 ; Duro y col., 2013 ).

Este estudio cubrió el análisis de filtros que contienen partículas PM<sub>10</sub> y PST para determinar la carga y variedad de bacterias. Los resultados demostraron una alta concentración de bacterias en el aire de la ciudad. La mayor concentración se observó en Febrero y la más baja en Septiembre.

Al realizar el análisis de la concentración bacteriana por separado, se observó el menor número de bacterias durante Febrero para la ubicación del Sur y en Agosto por la ubicación del Norte. El más alto grado de contaminación del aire por bacterias se encuentra en el área central de la ciudad.

Los casos de infecciones respiratorias agudas (IRAs) en la ciudad se producen principalmente en los grupos de edad más jóvenes, como se muestra en la Figura 2.3. Los patógenos identificados como generadores de estos IRA's fueron, *Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae* y *Pseudomonas*, entre otros. Fue posible aislar las bacterias que se encuentran en las muestras de aire; por lo tanto, la conclusión es que el aire es una de las principales vías de transmisión de agentes patógenos de las IRAs.

En el análisis de bacterias aisladas, se identificaron géneros que causan problemas de salud. Los grupos de población más vulnerables son los niños y los ancianos. Algunas de estas bacterias, tales como *Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae* y *Pseudomonas sp.* son patógenos oportunistas de las infecciones nosocomiales (intrahospitalarias), mientras que *S. paratyphi A*, *E. faecalis* y generalmente *enterobacterias* causan infecciones intestinales cuando se consumen alimentos contaminados. Medios de contaminación de estos alimentos pueden ser directos (manos y agua contaminada), o como se demuestra en este trabajo, el aire.

### **4.3 Análisis Microbiológico por Biología Molecular**

#### **4.3.1 Estandarización de la técnica**

##### **4.3.1.1 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos**

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células. La extracción del ADN de las muestras, tomadas de los filtros obtenidos de los muestreadores de partículas, se realizó de acuerdo al muestreo establecido. Se obtuvieron 24 muestras por cada semana durante un mes en cada período de

muestreo. Después se realizaron extracciones por duplicado de las 24 muestras semanales, con el fin de comparar resultados en la cuantificación de ADN así como también contar con más cantidad de ADN para futuras pruebas. Se analizaron en total 288 muestras a las cuales se les aplicó el protocolo de Gene Clean para realizar la extracción de ácidos nucleicos y se llevaron a cabo pruebas de cuantificación para obtener la concentración de los mismos, así como su grado de pureza, obteniéndose valores en un intervalo de 2.53 a 30.63 ng/ $\mu$ L de concentración. En el primer período de muestreo se obtuvo una recuperación favorable de ADN con un promedio de 11.31 ng/ $\mu$ L, así como también una pureza adecuada con un promedio de 2.15, en el segundo período de muestreo los resultados muestran una concentración promedio de 11.06 ng/ $\mu$ L y una pureza con promedio igual a 2.30 y en el tercer período de muestreo se obtuvo una concentración promedio de 8.58 ng/ $\mu$ L con una pureza promedio de 1.98. Si la relación de absorbancia 260/280 para medir la pureza se encuentra entre 1.7 y 2.1 la preparación de ADN se considera adecuadamente libre de impurezas. Una relación menor indica contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol y valores por encima de 2 indican que hay ARN disperso (Muller y Schweizer, 1996). Las Figuras 4.16, 4.17 y 4.18 muestran los resultados de las concentraciones promedios en ng/ $\mu$ L en cada uno de los periodos muestreados.

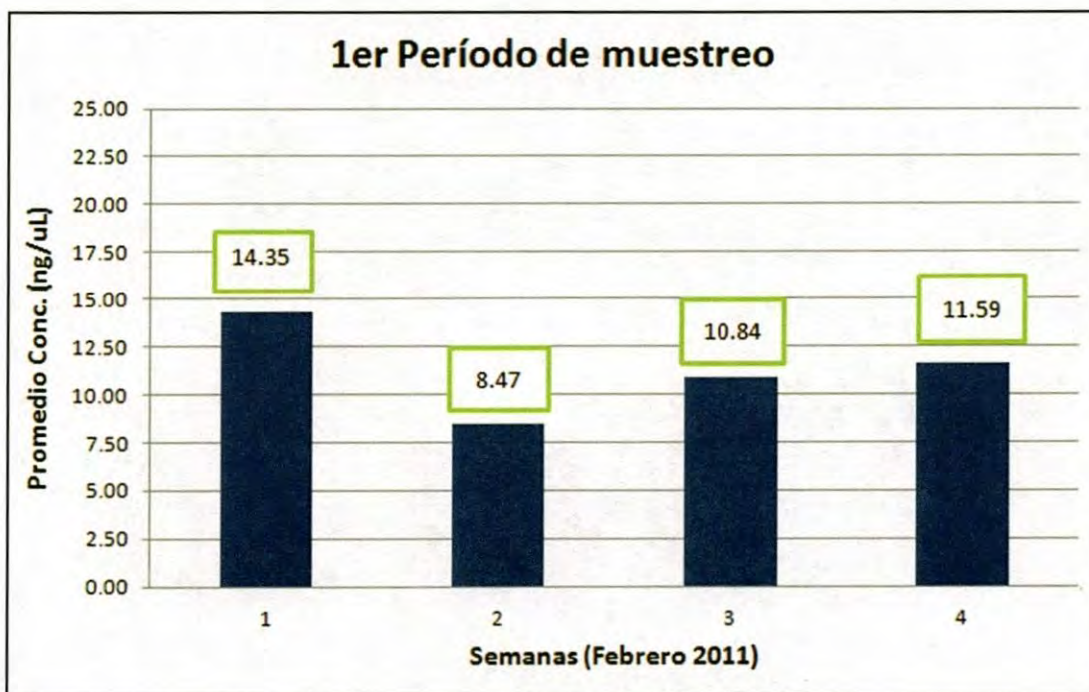


Figura 4.16. Promedio de concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN de las muestras que corresponden al primer período de muestreo.



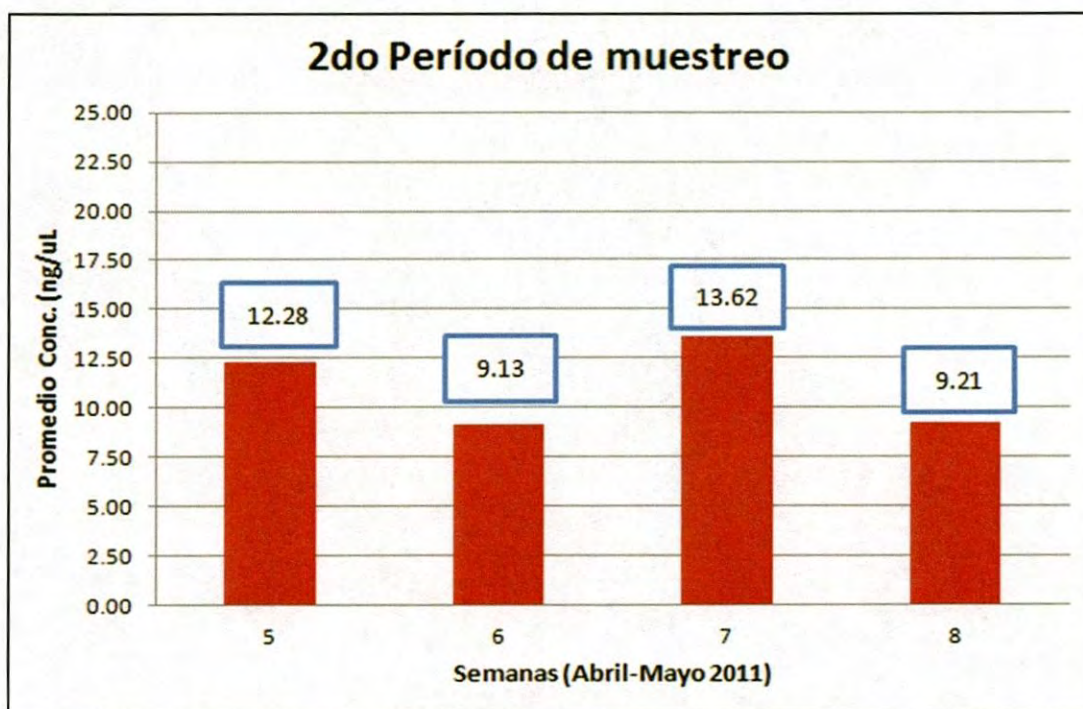


Figura 4.17. Promedio de concentraciones (ng/μL) de ADN de las muestras que corresponden al segundo período de muestreo.

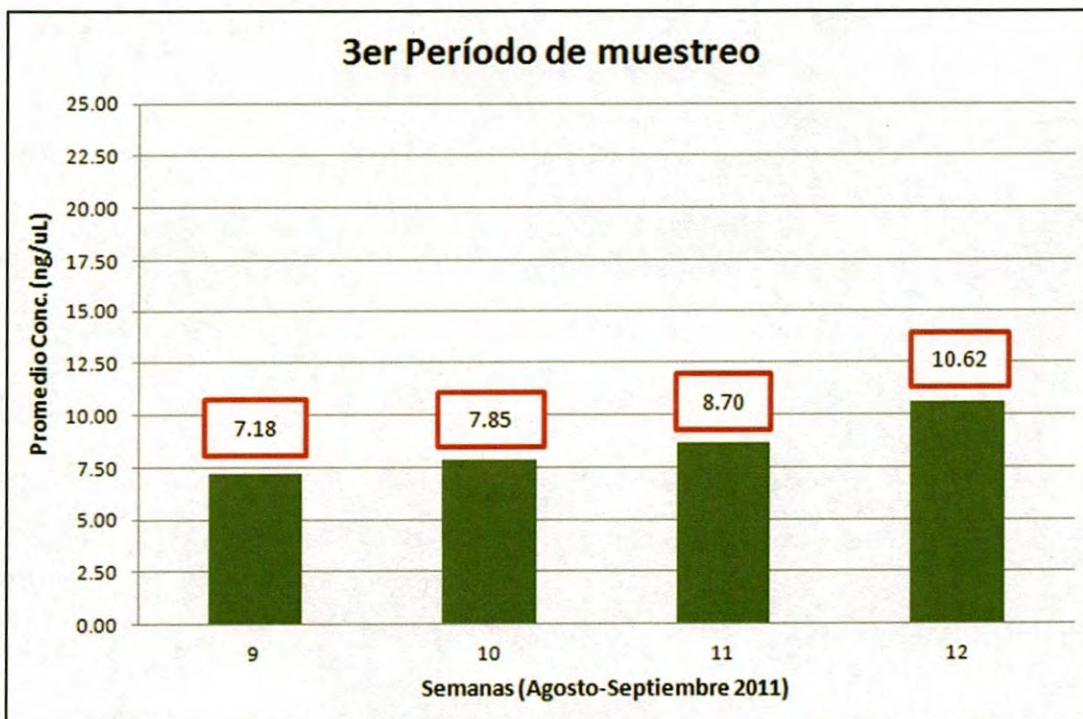


Figura 4.18. Promedio de concentraciones (ng/μL) de ADN de las muestras que corresponden al tercer período de muestreo.

Estos resultados muestran que la técnica de extracción de ácidos nucleicos mediante el protocolo de Gene Clean normal aplicada en el tratamiento de los filtros con partículas atmosféricas usados en los muestreadores de partículas de alto volumen, permite obtener valores de concentración de ADN aceptables, así como un grado de pureza adecuada para lograr una amplificación satisfactoria y tener éxito en la identificación de microorganismos mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

#### **4.3.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa**

La PCR es la técnica más importante en la biología molecular porque con ella se ha logrado la simplificación e innovación de muchas técnicas moleculares que permiten abordar nuevas líneas de investigación en diferentes ramas de la ciencia como biotecnología, ecología, evolución, biología de la conservación, arqueología, patología, medicina forense, entre otras (Cornejo y col., 2014). La PCR es específica, sencilla y rápida. En particular, la PCR en tiempo real ha sido ampliamente aplicada en la investigación de aerosoles microbianos en reciente años debido a su alta sensibilidad y velocidad de detección en el análisis cuantitativo y cualitativo de ADN y ARN (Li y col., 2013).

##### **4.3.1.2.1 Dilución de "primers" y gradiente de temperatura**

Parte de la estandarización de la técnica comprende la selección de la mejor dilución de "primers" debido a que es un factor importante y crítico para la obtención de los mejores resultados en la PCR. Las diluciones más utilizadas son 20, 10, 5 y 2.5 mM, las cuales se realizan a partir de la solución matriz de 200 mM preparada a partir de la solución liofilizada proporcionada por el proveedor.

Por lo que, para tener una solución de 100  $\mu\text{L}$  a 20 mM de una de 200 mM se determina el volumen necesario mediante la ecuación 4.

$$V_1 = \frac{V_2 * C_2}{C_1} \quad (4)$$

Dónde:

$$V_2 = 100 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 20 \text{ mM}$$

$$C_1 = 200 \text{ mM}$$

$$V_1 = \frac{100 \mu\text{L} * 20 \text{ mM}}{200 \text{ mM}}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{L}$$

De la solución concentrada requerimos 10  $\mu\text{L}$  y le agregamos 90  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura para llevarla a 100  $\mu\text{L}$  con una concentración de 20 mM.

De la misma forma para tener una solución de 100  $\mu\text{L}$  a 10 mM de una de 200 mM determinamos por la ecuación anterior el volumen necesario, donde:

$$V_2 = 100 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 10 \text{ mM}$$

$$C_1 = 200 \text{ mM}$$

$$V_1 = \frac{100 \mu\text{L} * 10 \text{ mM}}{200 \text{ mM}}$$

$$V_1 = 5 \mu\text{L}$$

De la solución concentrada requerimos 5  $\mu\text{L}$  y le agregamos 95  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura para llevarla a 100  $\mu\text{L}$  con una concentración de 10 mM.

Igualmente para tener una solución de 100  $\mu\text{L}$  a 5 mM de una de 200 mM determinamos por la ecuación anterior el volumen necesario, donde:

$$V_2 = 100 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 5 \text{ mM}$$

$$C_1 = 200 \text{ mM}$$

$$V_1 = \frac{100 \mu\text{L} * 5 \text{ mM}}{200 \text{ mM}}$$

$$V_1 = 2.5 \mu\text{L}$$

De la solución concentrada requerimos 2.5  $\mu\text{L}$  y le agregamos 97.5  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura para llevarla a 100  $\mu\text{L}$  con una concentración de 5 mM.

De igual forma para tener una solución de 100  $\mu\text{L}$  a 2.5 mM de una de 200 mM determinamos por la misma ecuación anterior el volumen necesario, donde:

$$V_2 = 100 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 2.5 \text{ mM}$$

$$C_1 = 200 \text{ mM}$$

$$V_1 = \frac{100 \mu\text{L} * 2.5 \text{ mM}}{200 \text{ mM}}$$

$$V_1 = 1.25 \mu\text{L}$$

De la solución concentrada requerimos 1.25  $\mu\text{L}$  y le agregamos 98.75  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura para llevarla a 100  $\mu\text{L}$  con una concentración de 2.5 mM.

Mediante estas operaciones obtenemos los “primers” diluidos con los cuales se realizaron las pruebas para determinar cuál dilución es la más apropiada o presenta mejores resultados al realizar las reacciones en cadena de la polimerasa.

En conjunto con las diluciones de primers se realizaron varias pruebas de PCR con variación de la temperatura para evaluar su comportamiento aplicando un gradiente de temperatura con incrementos de 2 °C en cada PCR y en un intervalo de 52 a 62 °C.

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas de gradiente de temperatura se pueden observar en las Figuras 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23 y 4.24. Como se puede notar en esta serie de gráficas donde se muestra el comportamiento de la dilución de “primers”, así como el gradiente de temperatura, solo se muestra la curva de melt y no la curva de amplificación, esto debido a que estas pruebas se llevaron a cabo en un termociclador convencional o de tiempo final.

En la amplificación a 52 °C se puede observar que las cuatro diluciones consideradas presentan buena amplificación, pero la dilución que presenta mejor resultado es el de 10 mM y en menor proporción la de 2.5 mM. En las cuatro diluciones se les incluyó un control negativo (agua) de las cuales ninguna presentó amplificación (Figura 4.19).

De igual forma que en la amplificación a 52 °C, la amplificación a 54 °C se puede observar que las cuatro diluciones consideradas presentan buena amplificación, pero la dilución que presenta mejor resultado es el de 10 mM y en menor proporción la de 2.5 mM. En las cuatro diluciones se les incluyó un control negativo (agua) de cuales ninguna presentó amplificación (Figura 4.20). Un comportamiento similar se puede observar para las demás temperaturas consideradas de 56, 58, 60 y 62 °C, así como en las demás diluciones de los “primers” (Figuras 4.21, 4.22, 4.23 y 4.24), por éste motivo se eligió la temperatura de 52 °C para las posteriores pruebas de PCR.

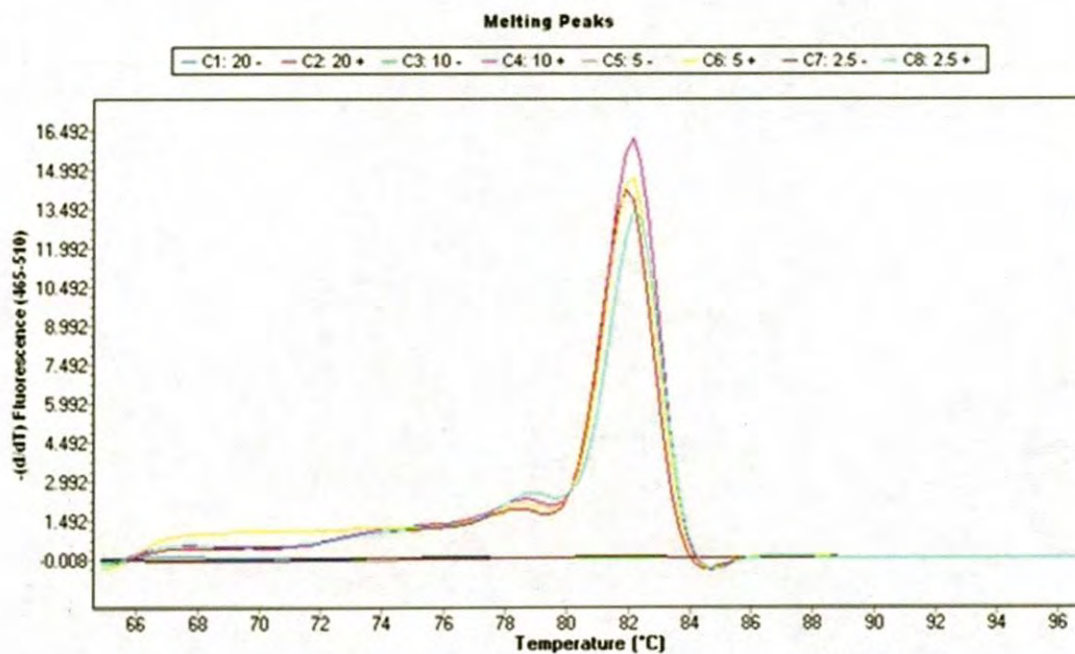


Figura 4.19. Gráfica de melt de PCR con 52 °C en la amplificación.

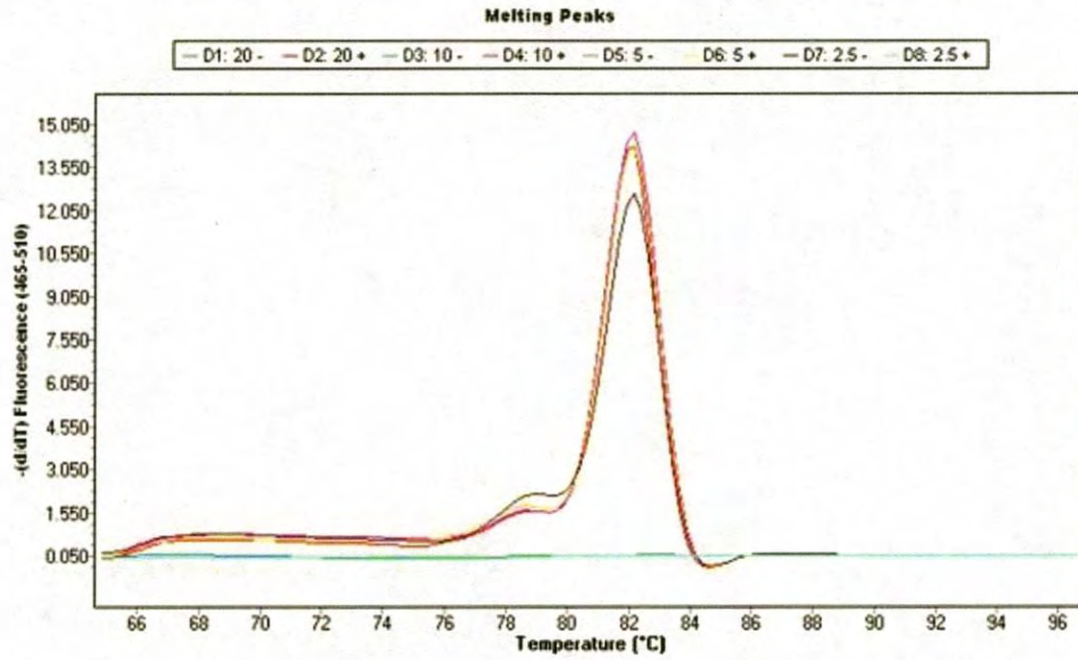


Figura 4.20. Gráfica de melt de PCR con 54 °C en la amplificación.

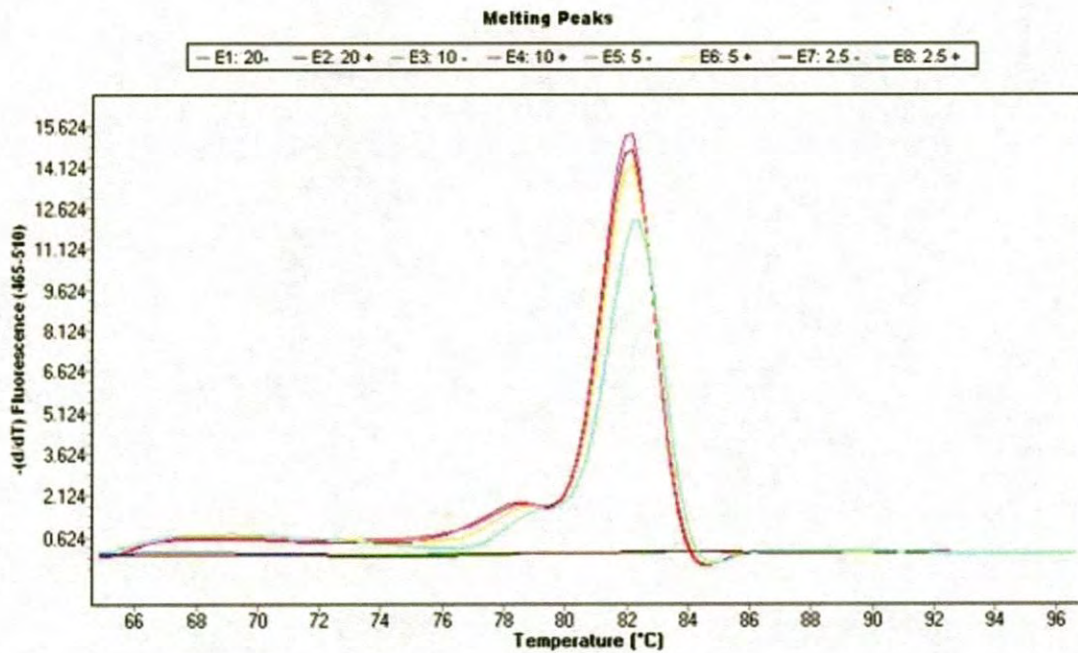


Figura 4.21. Gráfica de melt de PCR con 56 °C en la amplificación.

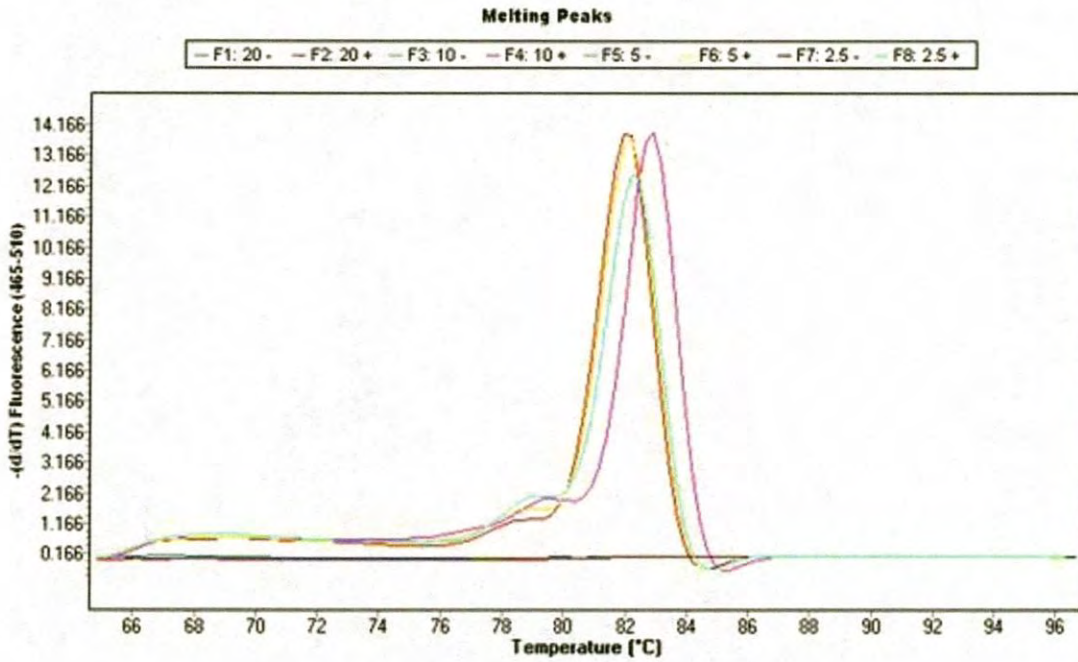


Figura 4.22. Gráfica de melt de PCR con 58 °C en la amplificación.

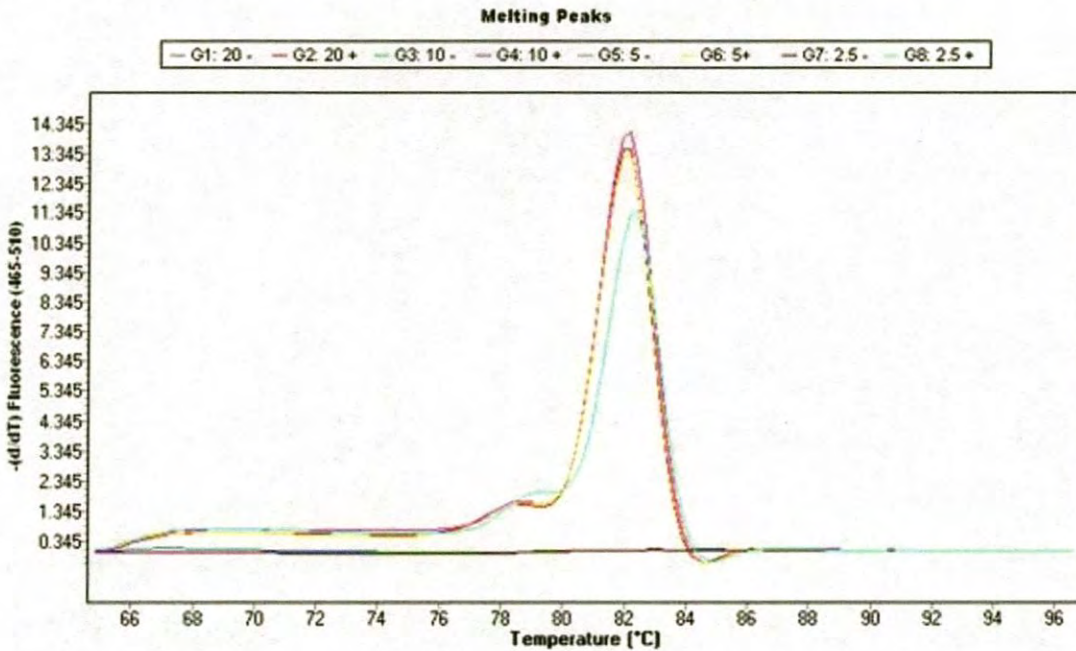


Figura 4.23. Gráfica de melt de PCR con 60 °C en la amplificación.

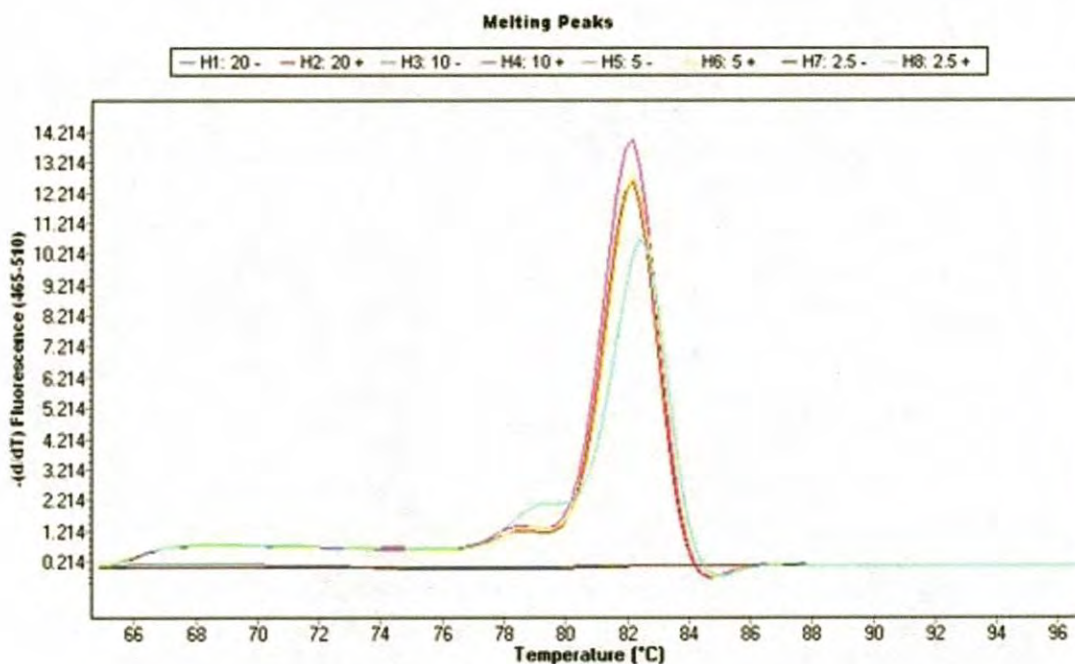


Figura 4.24. Gráfica de melt de PCR con 62 °C en la amplificación.

#### 4.3.1.2.2 Variación del volumen de DNA en la reacción de PCR

Se realizaron pruebas de PCR utilizando tres volúmenes diferentes de ADN de dos muestras positivas de *E. faecalis*, nombradas M1 y M2 cada una con 1, 2 y 3  $\mu\text{L}$ , además el control positivo y control negativo. En la Figura 4.25 se muestra el resultado de este PCR, donde se puede observar la curva de amplificación, en primer lugar el control positivo, seguida por la curva de la muestra dos (M2) con 2 y 3  $\mu\text{L}$  y después el resto de las muestras. También se puede apreciar el control negativo que no presentó amplificación. Aunque existe muy poca variación entre los resultados de las curvas de amplificación con 2 y 3  $\mu\text{L}$  de ambas muestras, la curva de 3  $\mu\text{L}$  presenta una leve mejoría con respecto a la de 2  $\mu\text{L}$ , por este motivo se toma en consideración el volumen de 3  $\mu\text{L}$  de muestra de ADN para realizar los PCR subsecuentes.



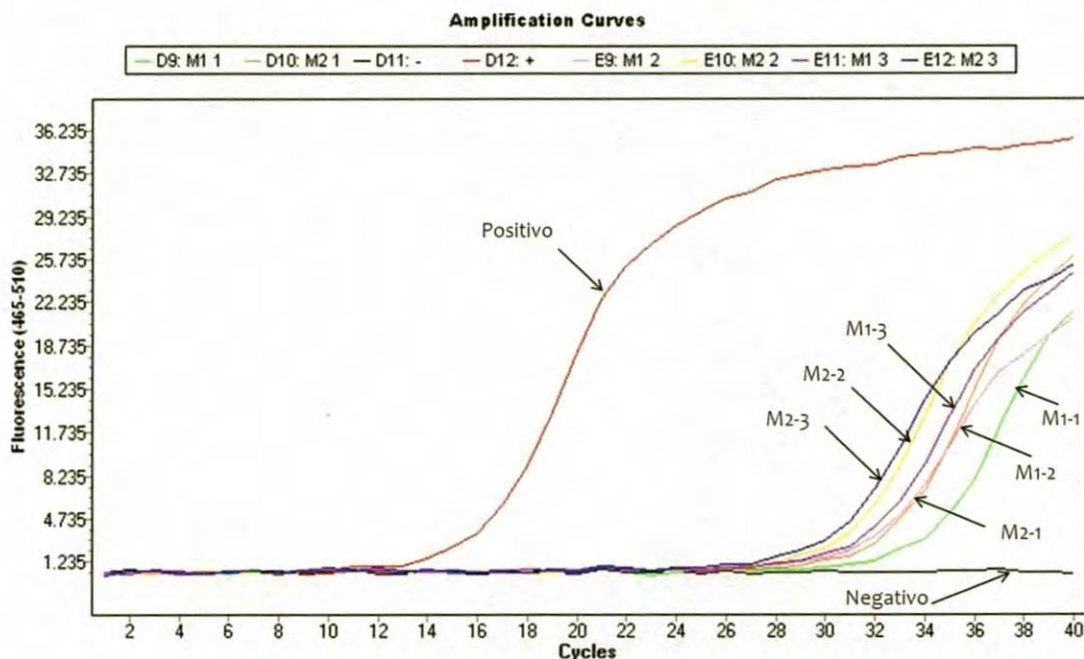


Figura 4.25. Gráfica de curva de amplificación de M1 y M2 con 1, 2 y 3  $\mu\text{L}$  de ADN en la reacción.

#### 4.3.1.2.3 Estudio de la especificidad de la amplificación

Se realizó PCR de algunas cepas de microorganismos otorgadas por el laboratorio de microbiología del CIBNOR Hermosillo con la finalidad de determinar si existía amplificación adicional al control positivo (*E. faecalis*). El ADN de las muestras incluidas en la reacción fueron *Staphilococcus áereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomona aeruginosa*. Se puede observar en la Figura 4.26 amplificación bien definida, únicamente del control positivo, aunque después del ciclo 35 se empiezan a levantar levemente las curvas de las demás cepas, lo cual pudiera indicar que éstas son positivas, pero si observamos la gráfica de la Figura 4.27 que muestra la curva de melt para estas mismas cepas, podemos apreciar que las muestras presentan indefinición en las curvas y si las comparamos con la curva del control positivo, estas presentan un patrón diferente al del control positivo lo que indica que los "primers" utilizados para identificar *E. faecalis* tienen una alta especificidad al no amplificar las demás muestras de ADN.

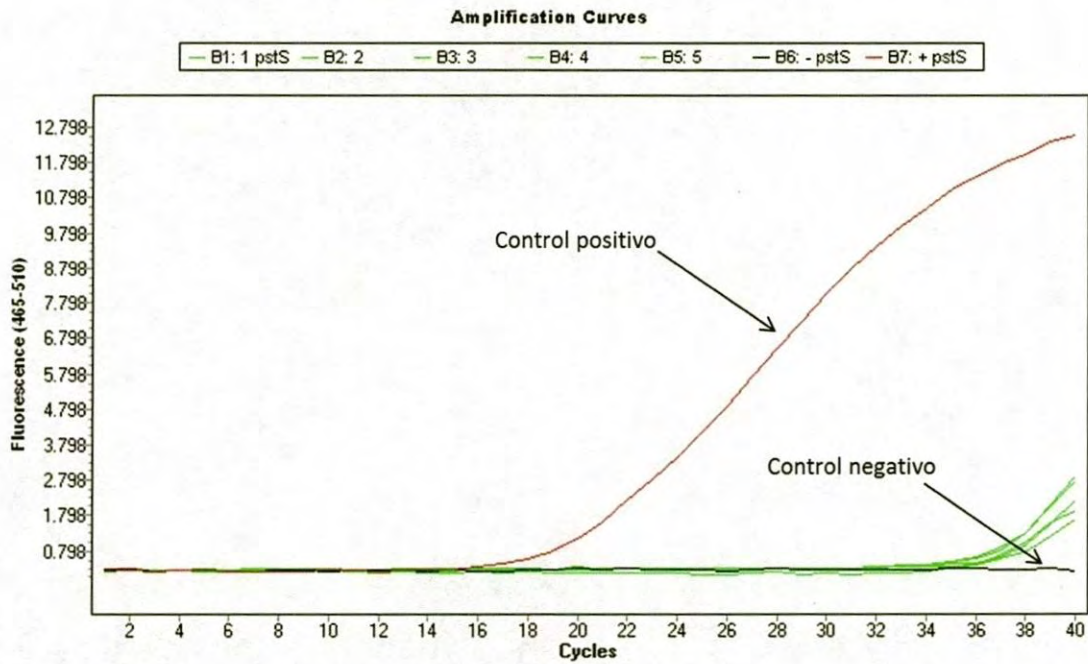


Figura 4.26. Gráfica de curva de amplificación de diferentes cepas.

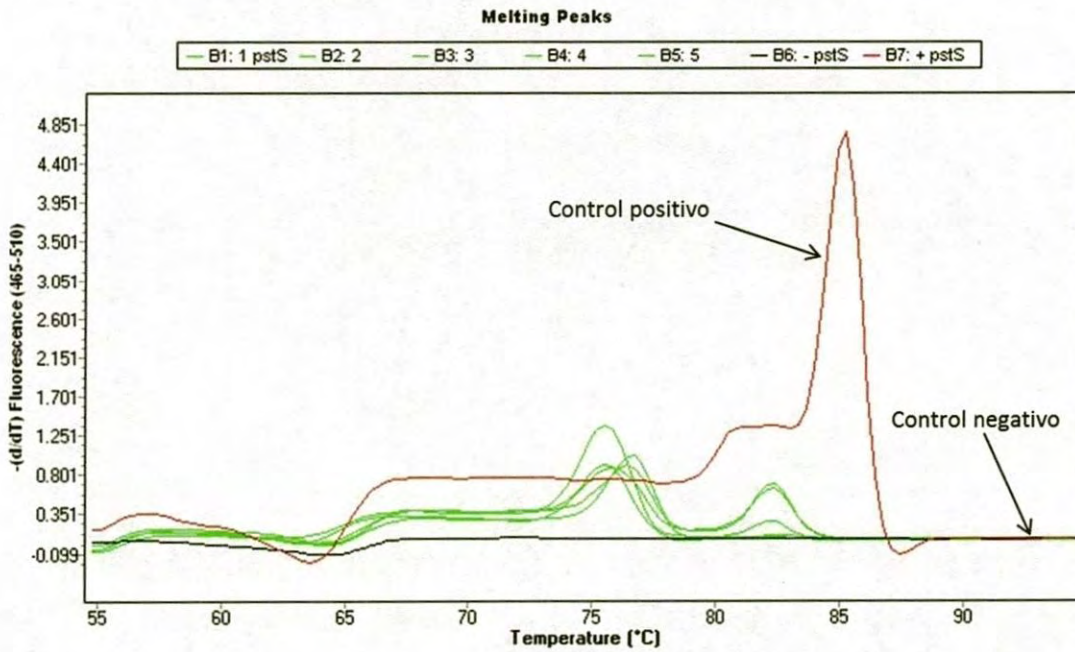


Figura 4.27. Gráfica de curva de melt de diferentes cepas.

#### 4.3.1.2.4 Análisis de la sensibilidad de la técnica

Para determinar la sensibilidad de la técnica se realizaron diluciones seriadas de la mezcla de una cepa de *E. faecalis* y medio de cultivo BHI ajustando absorbancia a 0.12 en una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro (lector de microplacas marca BIO-TEK, modelo Synergy HT-l) para conocer la concentración de bacterias. Fijando estos parámetros en el espectrofotómetro se logra una concentración de  $1.5 \times 10^8$  de bacterias por mL la cual se toma como referencia y mediante la ecuación 4.1 se realizaron los cálculos para determinar las diluciones siguientes hasta  $1:1 \times 10^7$ , la concentración de bacterias en esta dilución es de 15 bacterias por mL. La Tabla 4.4 muestra la concentración de bacterias en 1 mL en la solución de referencia y en cada una de las diluciones.

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2 \quad (4.1)$$

**Tabla 4.4. Concentración de bacterias en cada una de las diluciones empleadas.**

DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS/mL
REFERENCIA	$1.5 \times 10^8$
$1 : 1 \times 10^1$	$1.5 \times 10^7$
$1 : 1 \times 10^2$	$1.5 \times 10^6$
$1 : 1 \times 10^3$	$1.5 \times 10^5$
$1 : 1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$
$1 : 1 \times 10^5$	$1.5 \times 10^3$
$1 : 1 \times 10^6$	$1.5 \times 10^2$
$1 : 1 \times 10^7$	$1.5 \times 10^1$

A estas diluciones se le realizó la extracción de ácidos nucleicos los cuales se utilizaron para realizar el PCR y llevar a cabo el análisis de sensibilidad. En la Figura 4.28 se puede observar la gráfica con el resultado de las curvas de amplificación de cada una de las diluciones, así como el control positivo y el control negativo;

donde se puede apreciar que, aparte del control positivo, las diluciones que muestran amplificación son, desde la solución de referencia hasta la dilución de  $1 \times 10^4$ , la cual corresponde a una concentración de 15 bacterias por  $\mu\text{L}$ . Este resultado nos indica que la técnica utilizada muestra una alta sensibilidad, el cual es uno de los parámetros importantes a evaluar y criterio de aceptación de la técnica. Lo ideal hubiera sido que la dilución de  $1 \times 10^5$  hubiera amplificado ya que en este caso la concentración mínima sería de 1.5 bacterias por  $\mu\text{L}$ , la cual no amplificó. Es razonable que las diluciones subsecuentes no hubieran presentado amplificación ya que se están manejando concentraciones de fracciones de bacteria lo cual es imposible de replicar.

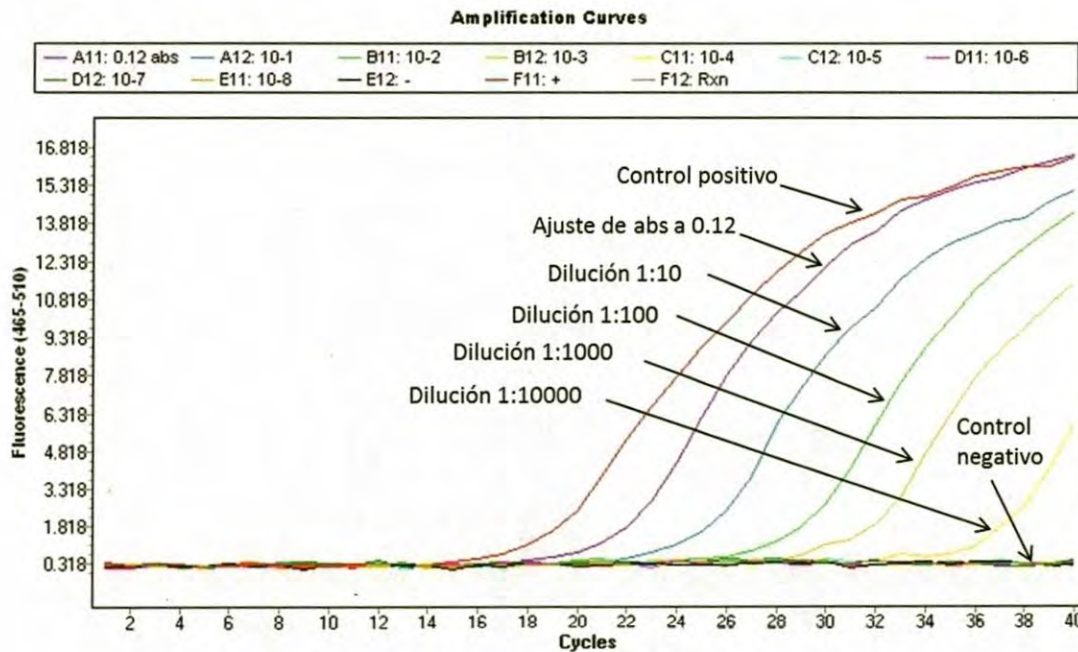


Figura 4.28. Gráfica de curvas de amplificación de las diluciones.

La Figura 4.29 muestra la gráfica con las curvas de melt, resultado del PCR del análisis de sensibilidad, la cual corrobora los resultados presentados en la Figura 4.28 de las curvas de amplificación, donde se puede apreciar el comportamiento de las diluciones con los picos definidos en la temperatura próxima a los  $85^{\circ}\text{C}$  y muy similares al pico del control positivo.

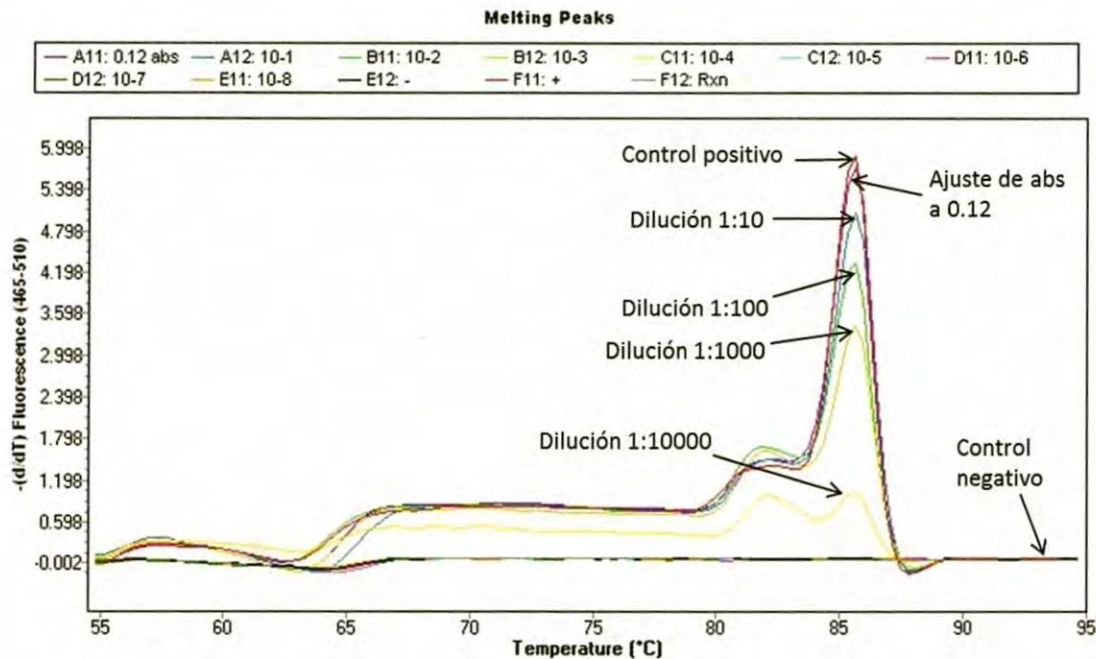


Figura 4.29. Gráfica de curvas melt de las diluciones.

#### 4.3.1.2.5 Identificación de *E. faecalis*.

Una vez formalizada la estandarización, el estudio de sensibilidad y de especificidad de la técnica de PCR para identificación de *E. faecalis*, se tomaron muestras de los filtros con partículas (una muestra de cada filtro) y se realizó PCR. La Figura 4.30 muestra la gráfica con los resultados de las curvas de amplificación, donde se observan las muestras positivas a *E. faecalis* de los filtros muestreados. La Tabla 4.5 muestra la relación de los filtros numerados correspondientes a cada uno de los periodos y estaciones de muestreo donde se puede observar por colores muestras positivas y negativas. Las de color rojo corresponden a muestras positivas y las verde a muestras negativas. De ésta tabla se derivan las Figuras 4.31 y 4.32 que representan los porcentajes de las muestras positivas a *E. faecalis* en cada uno de los periodos y estaciones de muestreo. En la Figura 4.31 se puede observar que en el periodo 3 (Agosto-Septiembre) presentó el porcentaje más alto, de muestras positivas, en todos los sitios de muestreo, coincidiendo con el periodo 2 (Abril-Mayo) en la estación Norte y con el periodo 1 (Febrero) en la estación Noroeste. También se puede observar que en la estación Centro, en el Periodo 3, y en la estación Norte, en el Periodo 2 y 3, el 100 % de las muestras analizadas resultaron positivas. La Figura 4.32 representa de manera general, el porcentaje de muestras positivas a *E. faecalis* por estación de muestreo, donde se puede observar que de las muestras analizadas, resultaron positivas, el 50 % en el Sur, el 66 % en el Centro y Noroeste y el 75 % en el Norte.

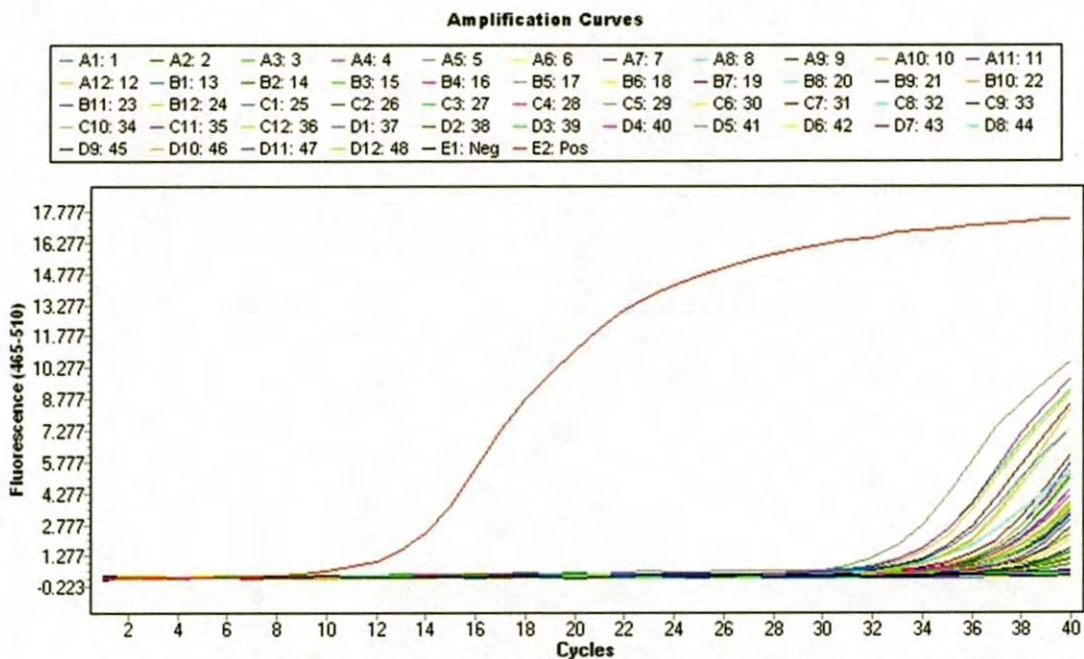


Figura 4.30. Gráfica de curvas de amplificación de muestras de filtros con partículas atmosféricas.

Tabla 4.5. Número de filtro en cada uno de los Periodos y estaciones de muestreo.

ESTACIONES	PERIODOS											
	FEBRERO				ABR-MAY				AGOS-SEPT			
SUR	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41	45
CENTRO	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46
NORTE	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39	43	47
NOROESTE	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48

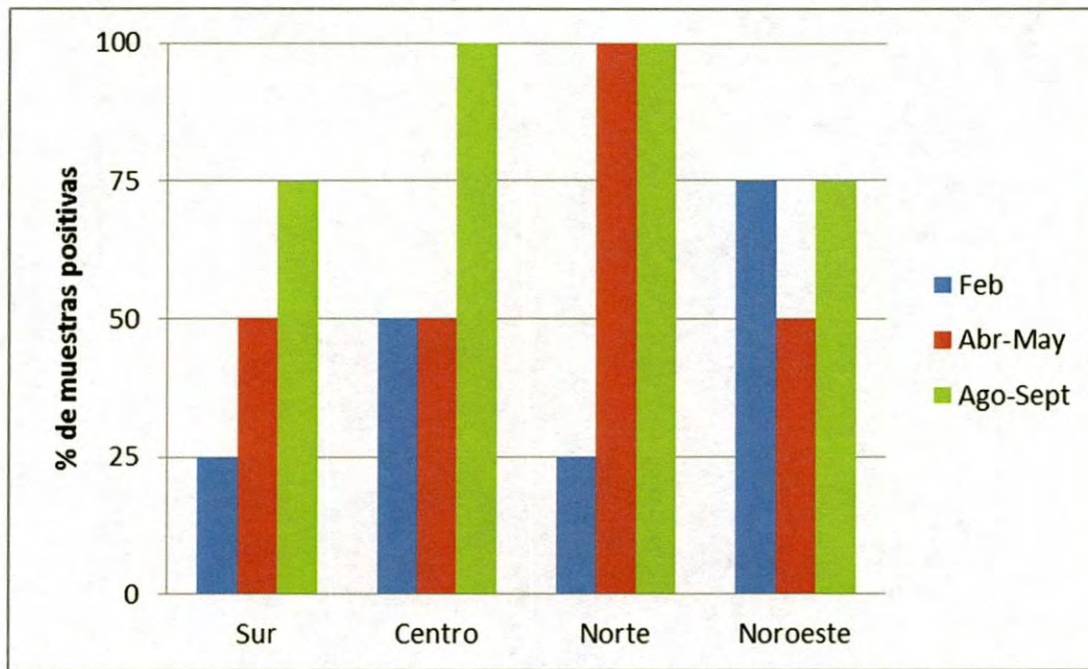


Figura 4.31. Gráfica de porcentajes de muestras positivas a *E. faecalis* por Periodo y sitio de muestreo.

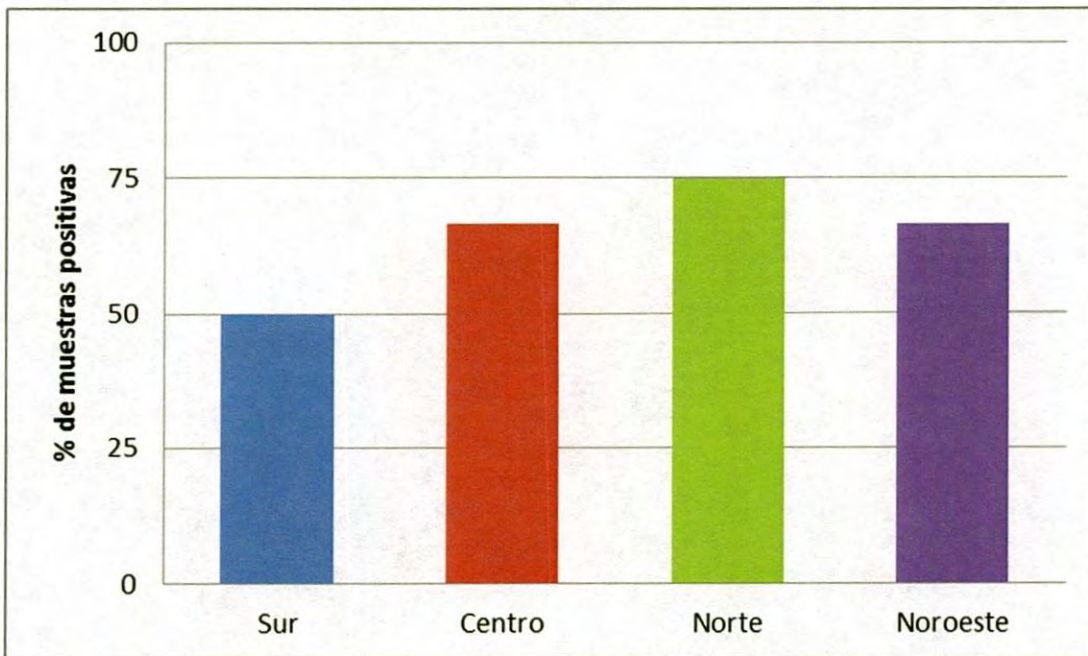


Figura 4.32. Gráfica de porcentajes de muestras positivas a *E. faecalis* por sitio de muestreo.

Estos resultados muestran que la técnica de PCR estandarizada, es efectiva en el tratamiento de muestras provenientes de los filtros (de microfibras de cuarzo o de vidrio) de muestreadores de aire de alto volumen para la identificación de *E. faecalis*.

Entre los métodos que actualmente se utilizan para la detección y análisis de los aerosoles microbianos se encuentran el recuento en placa, el examen microscópico directo, el método espectrográfico, el método de biosensor y los métodos moleculares. En este último grupo se encuentra la técnica de la PCR Tiempo Real (TR), ya que no sólo tiene alta especificidad, sencillez y comodidad en su operación, sino que también proporciona datos cuantitativos y cualitativos de ADN o ARN. Por lo que es fácilmente aplicable a la detección de aerosoles microbianos (Li y col., 2013).

Es importante mencionar que la mayoría de los estudios realizados para el análisis de las partículas atmosféricas con el objetivo de identificación de microorganismos, se han llevado a cabo mediante el impacto directo en medios de cultivo o en el tratamiento de filtro (de teflón) de muestreadores de aire de bajo volumen, los cuales operan por periodo cortos y no es posible determinar el flujo de aire muestreado el cual se requiere para determinar la concentración de microorganismos, por lo que solo se utilizan para detectar la presencia o no presencia de los microorganismos

La estandarización de la técnica de PCR para identificar *E. faecalis* a través del análisis de los filtros que son utilizados por los muestreadores de aire de alto volumen es un paso importante que da pie a futuros análisis para identificar otros microorganismos que causan enfermedades a través del aire, tales como bronquitis, neumonía, meningitis, tuberculosis, etc., ya que la atmósfera es un medio para la dispersión de muchos tipos de microorganismos como esporas, bacterias, virus y hongos (De la Rosa y col., 2002).



## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La concentración de partículas atmosféricas se analizó en cuatro lugares diferentes de la ciudad de Hermosillo, México. Los niveles de concentración que excedieron los límites permisibles por las Normas Oficiales Mexicanas, se observaron sólo durante el mes de Mayo, en la estación Sur. Los resultados indican que en Hermosillo, por lo menos en 2011, debido a la baja concentración de partículas  $PM_{10}$  y PST, no presentó mayores problemas de contaminación de partículas en las zonas muestreadas.

Los resultados de concentración de los elementos químicos identificados mediante el microanálisis por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X de las muestras de  $PM_{10}$ , muestran que el Aluminio, Estroncio y Calcio fueron los elementos que tuvieron los valores más altos de concentración determinada para las estaciones Sur, Norte y Noroeste; y el Carbono para las PST en la estación Centro, de los cuales el Aluminio, junto con el Hierro y el Magnesio son de especial interés, principalmente por las altas concentraciones que registran y que pueden ser perjudicial para la salud de la población.

Los resultados de la distribución de partículas de  $PM_{10}$  y PST, muestran que aproximadamente el 60 % del total de partículas contabilizadas en cada una de las estaciones de muestreo, corresponde a partículas finas menores de  $2.5 \mu m$ , las cuales tienen mayor probabilidad de ingresar en las partes más profundas del sistema respiratorio y penetrar en otros tejidos y sistemas del cuerpo, donde pueden desencadenar una serie de reacciones o afectaciones.

Este estudio cubrió el análisis de filtros que contienen partículas  $PM_{10}$  y TSP para determinar la carga y variedad de bacterias. Los resultados demostraron una alta concentración de bacterias en el aire de la ciudad. La mayor concentración se observó en Febrero y la más baja en Septiembre. Al realizar el análisis de la concentración bacteriana por separado, se observó el menor número de bacterias durante Febrero para la ubicación del Sur y en Agosto por la ubicación del Norte. El más alto grado de contaminación del aire por bacterias se encuentra en el área central de la ciudad.

Se mostró información obtenida de los hospitales de casos de infecciones respiratorias agudas (IRA 's) en la ciudad. Los patógenos identificados como generadores de estas IRA's fueron, *Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae* y *Pseudomonas*, entre otros. Fue posible aislar las bacterias que se encuentran en las muestras de aire; por lo tanto, se concluye que el aire es una de las principales vías de transmisión de agentes patógenos de las IRA's.

En el análisis de bacterias aisladas, se identificaron géneros que causan problemas de salud. Los grupos de población más vulnerables son los niños y los ancianos. Algunas de estas bacterias tales como *Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae* y *Pseudomonas sp.* son patógenos oportunistas de las infecciones nosocomiales (intrahospitalarias), mientras que *Salmonella paratyphi A*, *E. faecalis* y generalmente enterobacterias causan infecciones intestinales cuando se consumen alimentos contaminados. Medios de contaminación de estos alimentos pueden ser directos (manos y agua contaminada) o, como se demuestra en este trabajo, el aire.

Los resultados obtenidos muestran que la técnica de extracción de ácidos nucleicos mediante el protocolo de Gene clean aplicada en el tratamiento de los filtros con partículas atmosféricas usados en los muestreadores de partículas de alto volumen, permite obtener valores de concentración de ADN aceptables, así como un grado de pureza adecuada para lograr una amplificación satisfactoria y tener éxito en la identificación de microorganismos mediante la PCR.

El estudio de sensibilidad de la técnica de PCR arrojó un resultado que indica que la técnica utilizada muestra una buena sensibilidad, la cual es uno de los parámetros importantes a evaluar y criterio de aceptación de la técnica.

Los resultados del análisis de PCR de algunas cepas de microorganismos, para determinar el grado de especificidad, indican que los "primers" empleados para la identificación de *E. faecalis* tienen alta especificidad al no presentar amplificación de las muestras de ADN de los microorganismos analizados.

Los resultados del análisis de las muestras de los filtros para determinar la presencia de *E. faecalis* muestran que en el Periodo 3 (Agosto-Septiembre) se presentó el porcentaje más alto de muestras positivas en todos los sitios de muestreo, coincidiendo con el Periodo 2 (Abril-Mayo) en la estación Norte y con el Periodo 1 (Febrero) en la estación Noroeste. También muestran que en la estación Centro, en el Periodo 3, y en la estación Norte, en el Periodo 2 y 3, el 100 % de las muestras analizadas resultaron positivas. De manera general, el porcentaje de muestras positivas a *E. faecalis* por estación de muestreo,

fue de 50 % en el Sur, de 66 % en el Centro y Noroeste y de 75 % en el Norte. Estos resultados muestran que la técnica de PCR estandarizada, es efectiva en el tratamiento de muestras provenientes de los filtros (de microfibra de cuarzo o de vidrio) de muestreadores de aire de alto volumen para la identificación de *E. faecalis*.

Los resultados obtenidos en este estudio, comprueban la viabilidad de la aplicación de la técnica de PCR RT para análisis microbiano. Esto va a permitir contar con una técnica, alternativa a las convencionales, que sea confiable y eficiente, pero sobre todo rápida y que se pueda aplicar cuando se presente una sintomatología característica en la población, que sugiera una posible contaminación biológica, que pudiera ser originada por algunos de los microorganismos anteriormente mencionados. Esto va a permitir al sector salud, ayudar en la toma de decisiones para tomar acciones tendientes a prevenir o a controlar las enfermedades que estos microorganismos pudieran ocasionar. Las técnicas de identificación basadas en el cultivo y las características fenotípicas de las bacterias son laboriosas y pueden requerir varias semanas para obtener resultados, lo cual no resulta viable cuando se analizan muestras de un paciente con un cuadro clínico grave. La aplicación de métodos de detección independientes de cultivo, como la PCR puede ayudar a resolver los problemas antes mencionados, al contar con tiempos de respuesta casi inmediatos en comparación con los métodos convencionales (Rojas, 2006). Como ejemplo se puede mencionar la tuberculosis, enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis* y cuyo contagio ocurre cuando la persona sana inhala microscópicas gotas de saliva procedentes del enfermo (llamadas aerosoles), que se generan cuando este tose o estornuda. Para aislar este microorganismo y diagnosticar la enfermedad utilizando técnicas tradicionales, se requieren de 25 a 30 días, un Periodo de espera muy largo para un paciente con un cuadro clínico severo. Con el uso de la biología molecular, específicamente con la PCR, una vez estandarizada la técnica, el diagnóstico se puede lograr en aproximadamente 3 horas de trabajo, una vez que la muestra a analizar se encuentre en el laboratorio.

Otra de las ventajas de la aplicación de esta técnica mediante el análisis de este tipo de filtros, es que se puede monitorear por sectores la ciudad, con el objetivo de vigilar posibles epidemias o brotes de enfermedades transmitidas por el aire y generar acciones preventivas en el sector afectado. Contrario a la práctica usual de proporcionar atención y tratamiento, cuando este se requiera a los pacientes que de manera individual asisten a los hospitales para su atención médica.

De acuerdo a los resultados presentados por el análisis de sensibilidad a los antibióticos, las colonias aisladas de *E. faecalis* fueron resistentes a casi todos los antibióticos en la mayoría de los casos; por lo

que, los pacientes que reciban tratamiento por problemas de esta bacteria, generalmente no serán eficaces. De acuerdo con los resultados presentados, la vancomicina es el único antibiótico recomendado para el tratamiento de los pacientes afectados por este tipo de bacterias. Debido al nivel de toxicidad y a los daños que ocasiona este antibiótico, se recomienda utilizar este tratamiento como una última opción.

Este es el primer informe de mediciones sistemáticas en busca de contaminación bacteriana del aire. Los resultados que se muestran en este trabajo sugieren que las bacterias patógenas de las vías respiratorias pueden ser transportadas por el aire, por lo que es necesaria la investigación de patógenos específicos, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Coccidioides sp.*

Este estudio está enfocado al análisis para la identificación de *E. faecalis* con resultados satisfactorios, por lo que se recomienda la estandarización de la técnica de PCR para la identificación de otros microorganismos que causan enfermedades a través del aire, tales como bronquitis, neumonía, meningitis, tuberculosis, entre otros.

## CAPÍTULO VI

### BIBLIOGRAFÍA

Aceves F. M. A., Pedraza O. J. C., Sotomayor O. A., Ramos A. J. M., Vargas S. J. E. y Tovar A. S. (2012). "Analysis of Key Features of Non-Linear Behavior Using Recurrence Plots. Case Study: Urban Pollution at Mexico City." *Journal of Environmental Protection* 3: 1147-1160.

Akhtar U. S., Rastogi N., McWhinney R. D., Urch B., Chow C. W., Evans G. J. y Scott J. A. (2014). "The combined effects of physico chemical properties of size-fractionated ambient particulate matter on in vitro toxicity in human A549 lung epithelial cells." *Toxicology Reports* 156, 1, 12.

Awad, A. H. A. (2007). "Airborne dust, bacteria, actinomycetes and fungi at a flourmill." *Aerobiologia* 23(1): 59-69.

Borrego S., Pons V. y Perdomo I. (2008). La contaminación microbiana del aire en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba, Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciencias Biológicas. 39(1).

Bou G., Fernández O. A., García C., Sáez N. J. A. y Valdezate S. (2011). "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología." *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29(8): 8.

Branis M. y Safránek J. (2011). "Characterization of coarse particulate matter in school gyms." *Environmental Research* 111(4): 485-491.

Breed R. M., Murray E. G. D. y Smith N.R. (1957). *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* (7th ed.) The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Cornejo R. A., Serrato D. A., Aguilar B. R. y Munive. M. G. R. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. SEMARNAT, INECC, UAM-I. 1ª Edición, 274 pp.

Cruz C. M. E., Gómez A. A., Quintero N. M. y Varela S. J. (2013). "Evaluación de la Calidad del Aire Respecto de Partículas Suspendidas Totales (PST) Y Metales Pesados (Pb, Cd, Ni, Cu, Cr) en la Ciudad de Hermosillo, Sonora, México, Durante un Periodo Anual." *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29(4): 15.

De la Federación, D. O. (2005). "Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-1993, Salud ambiental." Criterios para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto a material particulado.

De la Rosa, M. C., Mosso M. A. y Ullán C. (2002). "El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos." *Observatorio Medioambiental* 5 375-402.

Duro A., Piccione V. y Zampino D. (2013 ). "Air quality biomonitoring through pollen viability of Fabaceae." *Environ Monit Assess* 185(5): 3803-3817.

Fraga N. J., Rodríguez J., Fuentes O., Castex M. y Fernandez C. A. (2004). "Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar." *Rev Cubana Med Trop* 56(3): 6.

Frankel M., Timm M., Hansen E. W. y Madsen A. M. (2012). "Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure." *Indoor Air*.

Garza V. R., Hernández A. K. y mejía C. A. (2002). "Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*." *Lab-acta* 14: 11-20.

Ghosh D., Chakraborty P., Gupta J., Bisgwa A., Roy I., Das S., y Gupta-Bhattacharya S. (2012 ). "Associations between pollen counts, pollutants, and asthma-related hospital admissions in a high-density Indian metropolis." *J Asthma.* 49(8): 792-799.

Grisoli P., Rodolfi M., Villani S., Grignani E., Cottica D., Berri A., Picco A. M. y Dacarro C. (2009). "Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant." *Environmental Research* 109(2): 135-142.

Hermosillo, G. M. D. (2014). Programa de desarrollo urbano del Centro de población de Hermosillo (PDUCPH) 2014.

INE-SEMARNAT (2004). Microbiología ambiental.

INE-SEMARNAT (2009). Cuarto almanaque de datos y tendencias de la calidad del aire en 20 ciudades mexicanas (2000-2009).

Kalwasinska A. y Burkowska A. (2013). "Municipal landfill sites as sources of microorganisms potentially pathogenic to humans." Environ Sci Process Impacts: Inpress.

Leung P. Y., Wan H. T., Billah M. B., Cao J. J., Ho K. F. y Wong C. K. C. (2014). "Chemical and biological characterization of air particulate matter 2.5, collected from five cities in China." Environmental Pollution 194 8.

Li S., Li Y., Zhang L. y Miao Z. (2013). "Application of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) in Detection of Microbial Aerosols." Environmental Forensics 14(1): 16-19.

Menetrez M. Y., Foarde K. K., Esch R. K., Schwartz T. D., Dean T. R., Hays M. D., Betancourt D. A., Moore S. A. y Cho S. H. (2009). "An evaluation of indoor and outdoor biological particulate matter." Atmospheric Environment 43 8.

México, G. D. E. D. (2011). Programa para mejorar la calidad del aire de la Zona Metropolitana del Valle de México 2011-2020. PROAIRE 2011-2020.

Minguillón M. C., Campos A. A., Cárdenas B., Blanco S., Molina L. T. y Querol X. (2014). "Mass concentration, composition and sources of fine and coarse particulate matter in Tijuana, Mexico, during Cal-Mex campaign." Atmospheric Environment ( ) e329 88 10.

Monick M. M., Baltrusaitis J., Powers L. S. Borcharding J. A., Caraballo J. C. Mudunkotuwa I., Peate D. W., Walters K., Thompson J. M., Grassian V. H., Gudmundsson G. y Comellas A. P. (2013 ). "Effects of Eyjafjallajökull Volcanic Ash on Innate Immune System Responses and Bacterial Growth in Vitro." Environ Health Perspect. : In press DOI:10.1289/ehp.1206004.

Muller H. y Schweizer B. (1996). Biochemical applications for uv/vis spectroscopy: dna, protein, and kinetic analysis, Perkin Elmer, Inc, UK.

Newth D. y Gunasekera D. (2012). "An Integrated Agent-Based Framework for Assessing Air Pollution Impacts." Journal of Environmental Protection 3: 1135-1146.

Pérez V., Lunagómez R. M. y Acosta P. (2010). "Análisis de partículas suspendidas totales (PST) y partículas fracción respirable (PM<sub>10</sub>), en Cunduacán, Tabasco." Universidad y Ciencia 26(2): 151-162.

Pinilla B. G., Cubillos K. y Rodríguez M. (2008). "Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)." Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 6(9): 12.

Ramirez L. R., Esparza P. H. y Duarte M. A. (2007). "Characterization of inorganic atmospheric particles in air quality program with SEM, TEM and XAS." Revista Mexicana de Física 53 (3): 6.

Reoun A. H., Mainelis G. y White L. (2006). "Development and calibration of real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples." Atmospheric Environment 40 16.

Restrepo C. E., Simonoff J. S., Thurston G. D. y Zimmerman R. (2012). "Asthma Hospital Admissions and Ambient Air Pollutant Concentrations in New York City." Journal of Environmental Protection 3: 1102-1116.

Rojano R. E., Angulo L. C. y Restrepo G. (2013). "Niveles de partículas suspendidas totales (PST), PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> y su relación en lugares públicos de la ciudad Riohacha, Caribe Colombiano " Información Tecnológica 24(2): 10.

Rojas H. R. A. y González F. T. (2006). "Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa". Bioquímica, Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, A.C 31( 2): 8.

Ruiz G. P., Bonten M. J. M., Ashley R. D., Top J., Nallapareddy S. R., Torres C., Coque T. M., Cantón R., Baquero F., Murray B. E., del Campo R. y Willems R. J. L. (2006). "Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination." Journal of clinical microbiology 44(6): 2220-2228.

Sánchez C. J. M. (2012). "Características fisicoquímicas de los gases y partículas contaminantes del aire. Su impacto en el asma." Latreia 25(4): 369-379.

Sbarato V., Sbarato D., Basan R., Manzo P., Ortega J. E., Campos M. y Salort M. R. (2000). Análisis y caracterización del material particulado atmosférico, ciudad de Córdoba, Argentina.



Sepulveda, J. D. (2004). Perfil morfológico y químico elemental de partículas respirables en fuentes de emisión puntual y muestreos ambientales Informe final INE-CENICA.

Spangler, J. G. (2012). "Diabetes mortality and environmental heavy metals in North Carolina counties: An ecological study." Journal of Diabetes Mellitus 2(4): 369-372.

SSA, S. d. S. E. U. M. (1993). Norma Oficial Mexicana NOM-024-SSA1-1993. Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto a partículas suspendidas totales (PST). Valor permisible para la concentración de partículas suspendidas totales (PST) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población S. d. S. E. U. Mexicanos, Diario Oficial de la Federación, México.

SSA, S. D. S. E. U. M. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Vivanco M. G., Palomino I., Garrido J. L., González M. A., Alonso G. y Martín F. (2012). "Impact of the Transboundary Transport of Air Pollutants on Air Quality in Spain." Journal of Environmental Protection 3: 1167-1175.

Wark Kenneth, W. C. F. (2004). "Contaminación del Aire, Origen y Control." Editorial LIMUSA SA de CV, Grupo Noriega Editores, México, DF.

Weighardt F. (2011). "Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión 10. PCR Cuantitativa para la Detección de OGM." Enlace: [http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual% 20ES/Sesi% C3% B3n10. pdf](http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n10.pdf), Joint Research Center. Institute for Health and Consumer Protection, Fecha de Consulta: 26 Marzo 2011.

Zárate M. S., Romano V., Nieves J. y Smayevsky J. (2014). "Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias." Rev Argent Microbiol. 2014;46(2):98-102 46(2): 5.

## ANEXOS

### ANEXO A

#### **Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

La microscopía electrónica de barrido es una técnica de análisis superficial, que consiste en enfocar sobre una muestra electrodensa (opaca a los electrones) un fino haz de electrones acelerado con energías de excitación desde 0.1 kV hasta 30 kV.

El haz de electrones se desplaza sobre la superficie de la muestra realizando un barrido que obedece a una trayectoria de líneas paralelas. La variación morfológica de la muestra entrega diversas señales (electrones secundarios, electrones retrodispersados, emisión de rayos X, etc.) que son recogidas por distintos detectores; los cuales permiten la observación, caracterización y microanálisis superficial de materiales tanto orgánicos como inorgánicos.

Debido a que el límite de amplificación de un microscopio óptico está restringido por la longitud de onda de la luz visible; los microscopios electrónicos emplean electrones, que tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz y pueden revelar estructuras mucho más finas. La longitud de onda más corta de la luz visible es de alrededor de 4.000 Å ( $1 \text{ Å} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$ ). La longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de 0.5 Å aproximadamente.

Un microscopio electrónico de barrido funciona con un haz de electrones producido por una fuente de electrones que puede ser un cañón termoiónico (filamento de tungsteno o de hexaboruro de lantano) o un cañón de emisión de campo FEG, de las siglas en inglés Field Emission Gun.

Al cañón se le aplica un potencial eléctrico que acelera el haz de electrones hacia la columna, éste es focalizado por medio de lentes electromagnéticas sobre la muestra (toda la trayectoria de los electrones debe estar en vacío, de lo contrario, los electrones colisionarían con las moléculas de aire y serían absorbidos). Los electrones chocan e interactúan con la muestra produciendo varias señales que podrán

ser recogidas de acuerdo a los detectores presentes. La amplificación de la imagen se produce por un conjunto de lentes electromagnéticas que mediante un tratamiento adecuado de las señales electrónicas son proyectadas en un tubo de rayos catódicos (CRT). La Figura 7.1 muestra la estación del microscopio electrónico de barrido.

#### **Interacción del haz con la muestra:**

Cuando los electrones colisionan con la muestra se producen varios fenómenos:

**Electrones secundarios:** La propia muestra emite electrones secundarios debido a la colisión con el haz incidente para generar imágenes tridimensionales de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), la energía de estos electrones es muy baja, inferior a 50 eV, por lo que los electrones secundarios provienen de los primeros nanómetros de la superficie.

**Electrones retrodispersados:** Algunos electrones primarios son reflejados o retrodispersados tras interactuar con los átomos de la muestra. La intensidad de emisión de estos electrones está directamente relacionada con el número atómico medio de los átomos de la muestra ( $Z$  promedio), así los átomos más pesados producen mayor cantidad de electrones retrodispersados, permitiendo la obtención de imágenes planas de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image).

**Absorción de electrones:** La muestra absorbe electrones en función del espesor y la composición; esto produce la diferencia de contraste en la imagen.

**Emisión de rayos X:** Cuando los electrones de niveles internos son expulsados por la interacción de los electrones primarios, habrá transiciones entre los niveles de energía con emisión de rayos X, esta energía y longitud de onda están relacionadas con la composición elemental del espécimen, lo cual permite realizar análisis químicos mediante espectroscopia por dispersión de energía y de longitud de onda (EDS y WDS).

**Emisión de electrones Auger:** Cuando un electrón es expulsado de un átomo, otro electrón más externo puede saltar hacia el interior para llenar esta vacancia resultando en un exceso de energía. Esta energía extra puede ser liberada emitiendo un nuevo electrón de la capa más externa (electrón Auger). Son utilizados para obtener información sobre la composición de pequeñísimas partes de la superficie de la muestra.

Todas estas señales están relacionadas entre sí y dependen en gran medida de la topografía, el número atómico y el estado químico de la muestra; por lo tanto, un MEB suministra información morfológica, topográfica y composicional de las superficies de las muestras.

#### **Ventajas del MEB:**

1. Su gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes permitiendo enfocar y observar amplias zonas de la muestra al mismo tiempo.
2. Puede producir imágenes de alta resolución de hasta 3 nm, es decir, que detalles muy cercanos en la muestra pueden ser observados separadamente a alta magnificación.
3. La relativamente sencilla preparación de las muestras.
4. Se pueden observar muestras de tamaños desde centímetros hasta muestras del orden de nanómetros.

#### **Limitaciones del MEB:**

1. Las muestras deben ser conductoras.
2. Las muestras deben estar libres de humedad.
3. No es posible observar la estructura interna y detalles ultra estructurales de las muestras, para esto se requiere un Microscopio Electrónico de Transmisión MET o TEM, de las siglas en inglés Transmission Electron Microscopy.



**Figura 7.1.** Estación de microscopio electrónico de barrido.

## Preparación de muestras no biológicas

Muestras no conductoras:

Durante la observación, las muestras pueden experimentar una acumulación de carga que desvía el haz de electrones, provocando distorsiones en la imagen. Para evitar la carga de las muestras y obtener imágenes de alta calidad, es recomendable recubrir las muestras con una capa de algún material conductor, como el carbono o el oro antes de su examen. El recubrimiento con carbono u oro / oro paladio, se hace de acuerdo al tipo de imágenes o análisis que se desee obtener.

Este recubrimiento debe tener un espesor apropiado, de tal forma que permita la circulación de la corriente eléctrica que se deposita en la muestra y a la vez, no solape u oculte las características superficiales de interés.

Las muestras a estudiar en el MEB utilizan dos técnicas para mejorar la conductividad: el recubrimiento por pulverización y la evaporación térmica.

La técnica de recubrimiento con oro, es una técnica que consiste en el depósito de una película fina de material conductor sobre un substrato (muestra) en condiciones de baja presión ( $10^{-4}$  Torr). Gracias a la baja presión, las moléculas de metal se mueven desde la fuente de evaporación (blanco de oro) hasta la superficie a revestir, sin encontrar resistencia del aire u otras partículas gaseosas.

Esta técnica se emplea para la obtención de imágenes de electrones secundarios, ya que el oro es uno de los materiales que origina mayor emisión, conduciendo a mejores resultados.

La otra técnica utilizada es la evaporación con carbono, la cual consta de dos electrodos conectados a una fuente de corriente alterna de alta intensidad y bajo voltaje, entre los que se colocan dos barras de grafito, una con el extremo plano y la otra terminada en punta afilada. Los electrodos permanecen en contacto todo el tiempo gracias a que la barra afilada está ajustada con un fleje. El sistema está confinado en vacío para favorecer la deposición de la película. Al hacer pasar corriente, la punta afilada se sublima, rociando la muestra con una capa delgada de carbono.

Esta técnica es apropiada cuando se realiza microanálisis elemental (EDS), ya que el bajo número atómico del C lo hace casi transparente a los rayos X emitidos por la muestra.

El equipo utilizado para el recubrimiento de las muestras es un metalizador o evaporador de metales (Metalizador Dentom Vacuum Desk II) el cual se puede ver en la Figura 7.2.

### **Espectroscopia de Energía de Dispersión de Rayos X. (Sistema de Microanálisis EDS Inca x-sight)**

El microscopio de barrido electrónico tiene integrado un sistema de microanálisis por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X, EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy), Modelo Inca x-sight EDS System de Oxford, con un detector de silicio para elementos ligeros y resolución de 138 eV (Figura 7.3).

Cuando el haz de electrones colisiona con los electrones de las capas más internas de los átomos de la muestra, saca un electrón de su sitio, creando una vacancia; ésta es ocupada por un electrón de las capas más externas. La transición de la capa externa a una interna genera radiación X. Si la transición se produce en las capas cercanas a la interna se llama radiación de tipo K, si la transición ocurre en las capas más externas a la capa interna, se llama transición L, M, N, etc. y tienen las mismas subdivisiones de K. Para que se originen todas estas transiciones, los átomos deben tener electrones suficientes para producir todas las capas necesarias de electrones.

El detector de rayos X de dispersión de energías recoge un único espectro emitido por todos los elementos de la muestra a la vez; pero genera un impulso eléctrico para cada fotón de rayos X incidente, cuya altura es equivalente a la energía del fotón. Cada impulso eléctrico generado es separado y almacenado de acuerdo a su valor mediante un analizador multicanal de alturas de impulsos.

Típicamente se realizan análisis cualitativos de los constituyentes mayoritarios de las áreas de interés (1mm). No obstante, en muestras pulidas es posible hacer análisis cuantitativos, comparando la intensidad de los rayos X obtenida con la intensidad producida por una muestra patrón de composición conocida.

El sistema de microanálisis está equipado de un Dewar para almacenamiento de nitrógeno líquido (LN<sub>2</sub>) de 7.5 L, monitor con alarma LN<sub>2</sub>, circuito de acondicionamiento para eliminación de hielo y procesador de pulsos digital con adquisición de 50.000 cps.



Figura 7.2. Metalizador Dentom Vacuum Desk II.



Figura 7.3. Sistema de microanálisis.

La Tabla 7.1 muestra la concentración de los elementos químicos determinada a partir del microanálisis aplicado en los filtros de  $PM_{10}$  y en la Tabla 7.2 la relativa a PST.

Tabla 7.1. Concentración de elementos químicos en PM<sub>10</sub>.

Filtro	Concentración de elementos ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )								
	Mg	Al	P	S	Cl	K	Ca	Fe	Sr
1	0.33	1.30	0.31	0.18	0.21	0.44	1.20	0.41	1.38
3	0.10	0.37	0.09	0.10	0.03	0.10	0.30	0.12	0.37
4	0.45	2.65	0.33	0.37	0.26	0.84	1.36	0.78	1.58
5	0.49	2.12	0.27	0.22	0.13	0.76	1.76	0.94	1.34
7	0.08	0.44	0.11	0.06	0.02	0.13	0.35	0.21	0.59
8	0.96	5.83	0.56	0.55	0.20	2.23	4.07	2.71	2.53
9	0.14	0.57	0.18	0.08	0.14	0.20	0.56	0.22	0.99
11	0.05	0.25	0.10	0.03	0.01	0.06	0.15	0.06	0.66
12	0.11	0.57	0.20	0.05	0.17	0.17	0.35	0.18	1.08
13	0.30	1.28	0.26	0.33	0.15	0.48	1.28	0.62	1.28
15	0.11	0.46	0.12	0.06	0.08	0.13	0.33	0.25	0.83
16	0.52	2.82	0.47	0.36	0.18	1.09	1.98	1.26	2.02
17	0.84	3.70	0.54	0.46	0.20	1.40	2.42	1.94	2.57
19	0.01	0.06	0.02	0.01	0.00	0.02	0.05	0.02	0.07
20	0.24	1.62	0.17	0.26	0.02	0.71	1.06	0.63	1.17
21	0.58	2.51	0.29	0.35	0.13	0.87	2.26	1.34	1.22
23	0.10	0.31	0.04	0.07	0.01	0.10	0.26	0.13	0.32
24	0.21	1.05	0.14	0.12	0.04	0.35	0.81	0.47	0.81
25	0.06	0.28	0.09	0.11	0.17	0.12	0.17	0.11	0.42
27	0.04	0.14	0.07	0.03	0.02	0.04	0.09	0.07	0.37
28	0.07	0.36	0.11	0.12	0.06	0.11	0.24	0.15	0.60
29	0.12	0.54	0.10	0.13	0.03	0.17	0.48	0.27	0.57
31	0.00	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.05
32	0.23	1.21	0.17	0.18	0.14	0.38	0.83	0.63	1.04
33	0.04	0.14	0.07	0.08	0.01	0.05	0.14	0.07	0.34
35	0.00	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01	0.08
36	0.02	0.09	0.03	0.03	0.00	0.03	0.07	0.02	0.21
37	0.03	0.13	0.03	0.06	0.01	0.05	0.11	0.05	0.19
39	0.03	0.11	0.05	0.07	0.01	0.03	0.10	0.05	0.30
40	0.02	0.10	0.02	0.03	0.01	0.04	0.08	0.04	0.19
41	0.14	0.58	0.17	0.22	0.03	0.20	0.46	0.23	0.91
43	0.02	0.14	0.06	0.08	0.01	0.05	0.11	0.06	0.34
44	0.10	0.60	0.17	0.23	0.03	0.20	0.39	0.18	0.84
45	0.25	1.05	0.34	0.51	0.04	0.38	0.74	0.42	1.94
47	0.06	0.27	0.13	0.17	0.01	0.09	0.18	0.07	0.76
48	0.13	1.24	0.26	0.41	0.02	0.39	0.78	0.44	1.51



Tabla 7.2. Concentración de elementos químicos en PST.

Filtro	Concentración de elementos en $\mu\text{g}/\text{m}^3$							
	C	Mg	Al	S	Cl	Ca	Ti	Fe
2	26.25	0.13	0.00	0.24	0.17	0.55	0.08	0.81
6	22.84	0.34	0.66	0.29	0.14	1.29	0.21	1.44
10	5.26	0.06	0.09	0.07	0.12	0.17	0.05	0.23
14	21.46	0.35	0.45	0.31	0.36	1.36	0.24	1.17
18	20.02	1.03	2.35	0.59	0.22	2.31	0.34	2.56
22	22.53	0.78	1.84	0.73	0.24	2.88	0.20	2.54
26	3.96	0.35	0.84	0.28	0.53	0.99	0.19	0.91
30	4.53	0.55	1.47	0.49	0.22	1.68	0.21	1.38
34	3.54	0.23	0.40	0.44	0.15	0.80	0.15	0.59
38	0.00	0.24	0.83	0.58	0.09	1.07	0.11	0.70
42	3.23	0.39	1.12	0.69	0.03	1.21	0.17	1.01
46	2.39	0.23	0.68	0.69	0.06	0.62	0.15	0.69

## ANEXO B

### Muestreadores de Partículas para Microbiología

Existen diferentes tipos de muestreadores para colectar las partículas suspendidas en la atmósfera así como para determinar su distribución por tamaño. Algunos se han diseñado para el muestreo de polvo o partículas no viables, mientras que otros se usan exclusivamente para la colecta de bioaerosoles o microorganismos. A continuación se describirán algunos de los muestreadores cuyo uso es más frecuente en el área de la aerobiología para el aislamiento de bacterias.

#### Impactadores

El principio de colecta por impactación se basa en la tendencia de una partícula a desviarse del flujo de aire debido a la inercia, cuando la corriente de aire se curva al pasar por una superficie sólida o semisólida. Las partículas se separan de la corriente de aire y se impactan sobre la superficie.

#### Impactador de cascada

Dentro de esta clase de muestreadores el más usado en los estudios aerobiológicos es el impactador para partículas viables Andersen (Graseby, Atlanta, GA.). Este equipo está constituido por una serie de seis placas de aluminio, cada una con 400 orificios cuyo diámetro disminuye sucesivamente, por lo que la velocidad del aire se incrementa de una etapa a la siguiente. Succiona un flujo de aire de 28.3 L/min. (1 pie<sup>3</sup>) por medio de una bomba de vacío. Las partículas que son acarreadas en la corriente de aire, con un diámetro aerodinámico entre >15 a 1  $\mu\text{m}$ , son separadas por su tamaño en seis fracciones al pasar por las placas perforadas. Las partículas de una masa mayor son depositadas en la etapa superior, mientras que las partículas más pequeñas, capaces de mantenerse en el flujo de aire a baja velocidad, son transportadas sucesivamente a mayor velocidad y se impactan sobre la superficie de colecta de las siguientes etapas. Bajo cada placa se coloca una caja Petri con agar, en cuya superficie se desarrollarán las partículas viables. Existe una versión del impactador de cascada Andersen de dos etapas, cada una con 200 orificios. Al igual que el muestreador anterior, succiona un flujo de aire de 28.3 L/min y las partículas son separadas en las fracciones respirable y no-respirable. La etapa superior corresponde a las placas 1 y 2 del muestreador de seis etapas y la inferior a las etapas 3 a 6 (Figura 7.4).



Figura 7.4. Muestreadores de cascada Andersen de dos y seis etapas

### Muestreadores de una etapa

Existen diferentes modelos de muestreadores de una etapa. El muestreador portátil Burkard (Rickmansworth, England) colecta las partículas suspendidas con un flujo de aire de 10 L/min a través de una placa perforada con 100 orificios. Se recomienda el uso de este equipo para la colecta de partículas < 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una eficiencia > 95%. El muestreador N6-Andersen, el cual es una adaptación del

equipo de seis etapas, sólo usa la sexta etapa del muestreador. El uso de los impactadores de una etapa es más económico en términos del número de placas de agar requeridas y del tiempo empleado en el procesamiento de las muestras; sin embargo, presenta la desventaja de no fraccionar la muestra por tamaños.

### **Impactadores en líquido (Impingers)**

En este equipo de muestreo el aire succionado con una bomba de vacío se colecta directamente sobre un medio líquido. La mayoría de los impingers están hechos de vidrio Pyrex, con una sola cámara de colecta y un conducto para la succión del aire, el cual cuenta con un orificio crítico que determina la velocidad del flujo de aire.

Uno de los modelos es el AGI-30 (*all-glass impinger*), en el cual el flujo de aire llega a 30 mm de la base del muestreador. Esto incrementa la eficiencia del muestreo de partículas viables, ya que reduce la velocidad a la que son impactadas y disminuye el daño causado por el contacto con la base del muestreador. Este equipo funciona con un flujo de aire de 12.5 L/min y generalmente se usan 20 mL de medio de colecta. La ventaja de este muestreador es que se puede realizar una serie de diluciones del líquido de colecta cuando la concentración de microorganismos es muy alta.

El empleo de este tipo de equipo no se ha reducido únicamente a la colecta de partículas fúngicas y bacterias suspendidas en el aire, se ha empleado exitosamente en la colecta de algas, amibas de vida libre, virus y recientemente se ha utilizado el líquido de colecta en la detección de diversos microorganismos por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método de PCR es rápido y sensible, por lo que puede ser usado como una alternativa para la evaluación de la calidad del aire.

### **Impingers con fraccionamiento de tamaño**

En 1960 se diseñó un muestreador que combina las ventajas de coleccionar las partículas suspendidas dentro de un medio líquido, con la de fraccionar las partículas por su tamaño. Este muestreador es conocido como MSLI (*multistage all glass liquid impinger*) y se presenta en tres tamaños que coleccionan 55, 20 y 10 L/min por medio de una bomba de vacío. Las partículas suspendidas en la corriente de aire se separan en tres fracciones, que corresponden por su tamaño, a la depositación en la región extra-torácica, bronquial y alveolar del tracto respiratorio. Una alternativa al uso del MSLI, es el impactador en líquido Burkard, el cual al igual que el muestreador anterior separa las partículas en tres fracciones ( $>10 \mu\text{m}$ ;  $10\text{-}4 \mu\text{m}$ ;  $<4$

$\mu\text{m}$ ) con base en su diámetro aerodinámico (DA). La ventaja de este equipo es que está fabricado en aluminio, por lo que su diseño es más exacto, y existe un riesgo menor durante los muestreos ya que es menos frágil (Figura 7.5).



Figura 7.5. Muestreadores en fase líquida con fraccionamiento de tamaño.

### Muestreadores de centrífuga

La colecta de microorganismos por centrifugación permite la creación de un torbellino que produce que las partículas suspendidas en el aire se impacten sobre la superficie de colecta. El muestreador más común de este tipo es el Biotest RCS (Reuter Centrifugal Air Sampler, Alemania). El aire es succionado por el rotor del muestreador, que al girar crea una fuerza centrífuga y ocasiona la impactación de las partículas. Sobre las paredes de la cámara se coloca una tira plástica con agar en la que se desarrollarán las colonias de microorganismos, después de ser retirada del equipo e incubada a la temperatura adecuada. El motor funciona con baterías y succiona un flujo de aire de 40 L/min. Es un equipo pequeño y de fácil manejo, por lo que su uso se ha popularizado especialmente en la evaluación de la calidad microbiológica de ambientes hospitalarios. Sin embargo, no es un equipo recomendado para el muestreo de ambientes ocupacionales ya que la superficie de las tiras de agar se satura fácilmente (Ine-Semarnat, 2004).

## ANEXO C

### Protocolo de extracción de ADN (Gene clean)

1. Colocar la muestra en un tubo tipo eppendorf (1.7 mL), adicionar 300  $\mu$ L de solución de lisis y homogenizar con ayuda de un pistilo.
2. Centrifugar 5 minutos a 9000 gravedades.
3. Recuperar 50  $\mu$ l del sobrenadante del homogenizado y colocarlo en un tubo tipo eppendorf (1.7 ml).
4. Adicionar 150  $\mu$ l de sílica (Spin Glassmilk), agitar en vortex y dejar reposar durante 3 minutos.
5. Agitar nuevamente en vortex y dejar reposar durante 2 minutos.
6. Centrifugar durante 3 min a 9000 gravedades y desechar el sobrenadante.
7. Adicionar 500  $\mu$ l de TAE 1x – Alcohol (50:50) y agitar en vortex.
8. Centrifugar la muestra durante 3 min a 9000 gravedades y desechar el sobrenadante.
9. Repetir el paso 7 y 8.
10. Dejar secar por 10 minutos con tubos invertidos.
11. Agregar 50  $\mu$ l de agua DEPC, agitar en vortex y centrifugar 5 min a 6000 gravedades.
12. Recuperar 25  $\mu$ l y colocarlo en un tubo tipo eppendorf (0.22 ml).

#### Preparación de reactivos

Para preparar la solución de lisis se toma en consideración preparar una cantidad que permita trabajar con cierto número de muestras de tal manera que no se prepare mucho que se pudiera presentar el riesgo de contaminación, por lo que en nuestro caso se determinó preparar para 250 mL de solución. Los componentes de la solución de lisis son NaCl en 100 mM, Tris en 50 mM, EDTA en 100 mM y SDS al 1 %.

#### Solución de lisis...

La solución de lisis se adquiere comercialmente.

#### Cloruro de Sodio

NaCl 100 mM (L) PM = 58.44

Considerando el peso molecular de 58.44 gr en 1000 mM, con una regla de tres determinamos para 100 mM, lo que equivale a 5.844 gr para 100 mM en un litro. De igual manera con una regla de tres calculamos para 250 mL que sería 1.461 gr para NaCl 100 mM.

### **Trisma Base**

Tris 50 mM PM = 121.1 con un PH = 8

Considerando el peso molecular de 121.1 gr en 1000 mM, con una regla de tres determinamos para 50 mM, lo que equivale a 6.055 gr para 50 mM en un litro. De igual manera con una regla de tres calculamos para 250 mL que sería 1.5137 gr para Tris 50 mM.

### **EDTA**

EDTA 100 mM PM = 372.2 con un PH = 8

Considerando el peso molecular de 372.2 gr en 1000 mM, con una regla de tres determinamos para 100 mM, lo que equivale a 37.22 gr para 100 mM en un litro. De igual manera con una regla de tres calculamos para 250 mL que sería 9.305 gr para EDTA 100 mM.

### **SDS**

SDS 1 %

Considerando que para 1000 mL se utilizan 10 gr de SDS, con una regla de tres determinamos para 250 mL que sería 2.5 gr al 1 %.

Procedimiento para la preparación de la solución de lisis:

1. Pesar por separado cada uno de los productos.
2. Disolver el EDTA agua destilada y ajustar el PH a 8.
3. Agregar el Trisma Base y ya disuelto agregar el NaCl.
4. Agregar evitando hacer burbujas con SDS, agitar suavemente.
5. Aforar.

## **Sílica**

La sílica se adquiere comercialmente.

## **Solución de lavado**

Para la preparación de la solución de lavado los ingredientes requeridos son etanol al 96 % y buffer TAE 1X con una proporción uno a uno. Para preparar 250 mL de la solución se utilizó 125 mL de etanol al 96 % y 125 del buffer TAE 1 X. Para preparar el buffer TAE 1 X se requiere TEA y agua inyectable con una proporción 1:10, por lo que se utilizaron 112.5 mL de agua inyectable y 12.5 mL de TAE.

## **Agua DEPC**

El agua DEPC se adquiere comercialmente.

## **Procedimiento de cuantificación y uso del NANODROP 2000.**

El funcionamiento del espectrofotómetro NANODROP 2000 se funda en la transmisión de la luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto presente en la misma. El aparato funciona conforme a un principio sencillo: se irradia una muestra con una radiación luminosa de longitud de onda conocida y se mide la energía luminosa transmitida con una célula fotoeléctrica situada detrás de la muestra (Weighardt 2011).

Procedimiento de cuantificación:

1. Se limpia el pedestal aplicando 1  $\mu$ L de blanco.
2. Se pipetea 1  $\mu$ L de blanco y se calibra el equipo.
3. Con el brazo levantado se pipetea 1  $\mu$ l de muestra directamente sobre el pedestal.
4. Se cierra el brazo y se forma una columna con la muestra.
5. El pedestal se ajusta automáticamente a una altura óptima de lectura (0.05 mm-1 mm).

Cuando la lectura se completa, la superficie de ambos pedestales se limpia con papel especial de laboratorio y queda listo para la siguiente medida (Figura 7.6).

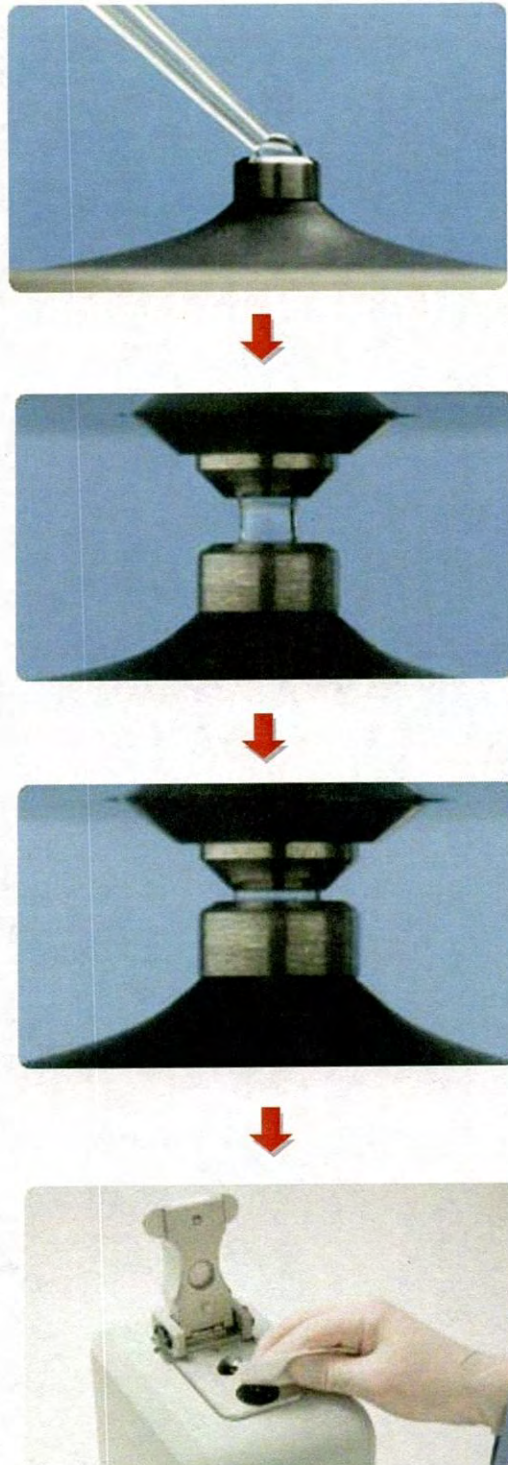


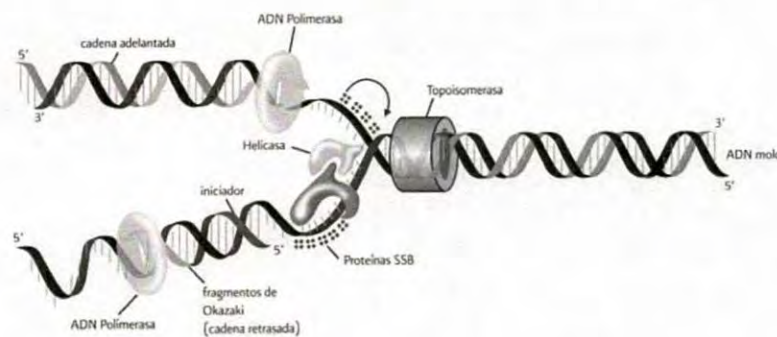
Figura 7.6. Diagrama del protocolo de cuantificación de ADN.



## ANEXO D

### Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. En procariontes se han encontrado al menos 12 proteínas involucradas en la replicación. Estas proteínas actúan en diferentes actividades, como: 1) la identificación del sitio de origen de la replicación; 2) el desenrollamiento de la doble hélice; 3) la estabilización de la estructura desenrollada; 4) la generación de cadenas iniciadoras complementarias con un extremo 3' libre que sirve de iniciador para que la ADN polimerasa comience su actividad catalizadora; 5) el avance de la bifurcación replicadora por desenrollamiento; 6) los pasos finales del ensamblaje de dos cadenas complementarias; 7) la identificación de los sitios de terminación y 8) el superenrollamiento de las dos nuevas moléculas de ADN (Figura 7.7). Sin embargo, la enzima más importante en la replicación es la polimerasa del ADN dependiente de ADN, comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN.



**Figura 7.7.** Proceso de replicación del ADN a nivel celular. Horquilla de replicación del ADN con algunas de las proteínas más importantes que participan en el proceso. La molécula original de ADN sirve de molde para que la ADN polimerasa genere una nueva copia de un fragmento de ADN. La ADN polimerasa celular requiere la presencia de un iniciador para llevar a cabo el proceso de replicación.

En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis (Espinosa, 2007). Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) que sustituye a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación celular. Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Tabla 7.3) (Cornejo y col. 2014).

Tabla 7.3. Copias de ADN generadas por la PCR en cada ciclo.

Ciclos	Copias de ADN
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	4,092
12	8,192
13	16,384
14	32,768
15	65,536
16	131,072
17	262,144
18	524,288
19	1,048,576
20	2,097,152
21	4,194,304
22	8,388,608
23	16,777,216
24	33,554,432
25	67,108,864
26	134,217,728
27	268,435,456
28	536,870,912
29	1,073,741,824
30	2,147,483,648