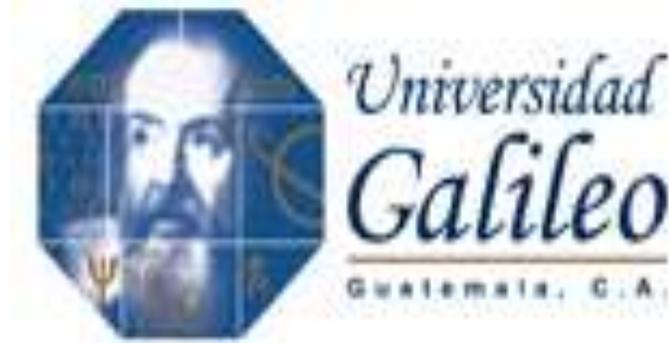


UNIVERSIDAD GALILEO

Escuela Ciencias de la Salud



“Monitoreo Microbiológico de aire de los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis de Alimentos del Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas de la Universidad Mariano Gálvez de Guatemala, con el Aeroscopio Eco MAS - 100.”

Trabajo de investigación presentado por:

MARIA MILAGRO GÓMEZ QUINTANILLA

Previo a optar al grado académico de:

**Licenciado en Ciencia y Tecnología de los
Alimentos**

Guatemala
2012

Monitoreo Microbiológico de aire de los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis de Alimentos del Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas de la Universidad Mariano Gálvez de Guatemala, con el Aeroscopio Eco MAS - 100.

DEDICATORIA

- A Dios Por permitir llegar hasta esta culminación de este Propósito dándome fuerza, persistencia, paciencia, capacidad y entrega.
- A Guatemala que aun con sus problemas es un País tan lindo.
- A la Universidad Mariano Gálvez de Guatemala.
- A la memoria de mis padres.
- A mis hijos por tener paciencia y apoyarme.
- A mis nietos que vinieron a llenarme de alegrías.
- A mi esposo por tener paciencia y darme apoyo en todo momento.
- A mis compañeros de trabajo que estuvieron en los momentos de mayor necesidad.
- A mi familia que aunque estén lejos siempre los siento cerca.
- A mis compañeros de estudio. que estuvieron en los momentos.
- A mis amigos en general.

GRADECIMIENTOS

- A la Universidad Galileo por permitirme realizar mis estudios.
- Al Dr. Rodolfo Solís por transmitirme sus conocimientos.
- A la Universidad Mariano Gálvez por permitirme realizar mi proyecto de Investigación dentro de las instalaciones del Instituto de Investigación Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas.
- A la Universidad Mariano Gálvez por proporcionar los Reactivos, Equipos y Materiales necesarios para poder realizar mi proyecto de Investigación.
- A la Licda. Eyda de Campollo por aportar sus conocimientos y por su apoyo incondicional en la elaboración y ejecución de mi proyecto de investigación.
- A la Licda. Suzette Boburg por aportar sus conocimientos y por su apoyo en la realización del proyecto.
- A la Licda. Ana Esther Barrientos por aportar sus conocimientos y por su apoyo en la realización del proyecto.
- A todos mis compañeros de trabajo que de una u otra forma me apoyaron en la realización del proyecto.
- A toda mi familia por su gran apoyo incondicional y paciencia.

I. SUMARIO

En el presente trabajo de Investigación se procedió a monitorear el aire interior de 5 áreas del Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas, (I²QB₃) utilizando el equipo Aeroscopio Eco MAS-100, las áreas monitoreadas fueron:

Área 1 = Área Blanca, Área 2 = Área Gris, Área 3 = Área Negra 1, Área 4 = Área Negra 2 (de los Laboratorio de Biotecnología) y Área 5 = Área de Análisis de Alimentos.

En estas se seleccionaron dos puntos de muestreo basándose en la infraestructura, la ubicación de los aires acondicionados y el tamaño de las áreas.

Para la toma de muestras de aire, se empleo el método volumétrico por impactación, utilizando un biocolector (Aeroscopio) Eco MAS-100 que posee una capacidad de absorción de 0-1000 L/minuto de aire. Seleccionando para nuestros fines, la capacidad de absorción de 100 L/min en el ambiente interior de cada uno de los laboratorios.

La identificación de las bacterias se inició con la tinción de Gram y para los hongos, con una tinción de Azul de Lacto fenol, tomando en cuenta las características macroscópicas y microscópicas, y posteriormente con las pruebas secundarias, por último se realizó la selección de 10 colonias, tanto de bacterias como hongos, para la identificación por secuenciación.

La identificación de las cepas seleccionadas, se realizó por medio del proceso de secuenciación genética en el equipo 3130 Genetic Analyzer, obteniendo los siguientes géneros bacterianos y fúngicos respectivamente:

A. Bacterias:

1. *Pseudomonas oryzihabitans** (ATCC=43272)
2. *Staphylococcus hominis novobiosepticus* (ATCC=7002)
3. *Bacillus subtilis subtilis* (ATCC=6051)
4. *Staphylococcus warneri* (ATCC=27836)
5. *Pseudomonas stutzeri* (ATCC=17588)
6. *Acinetobacter genomoespecies 3** (ATCC=17922)
7. *Kocuria kristinae** (ATCC=27570)
8. *Staphylococcus kiosii* (ATCC=43959)
9. *Staphylococcus capitis capitis* (ATCC=27840)
10. *Paenibacillus pabuli** (ATCC=43899)

B. Hongos:

1. *Ascochyta fabae* (CBS=524.77)
2. *Cladosporium cladosporoides* (DSM=62121)
3. *Rhodotorula mucilaginosa* (CBS =316)
4. *Penicillium citrinum* (CBS =139.45)
5. *Aureobasidium pullulans* (CBS =584.75)
6. *Chaetomium globosum* (CBS =149.6)
7. *Penicillium oxalicum* (DSM =898)
8. *Penicillium citrinum* (CBS =139.45)

En dichas áreas se logró realizar el conteo de ufc/m³ obteniendo resultados satisfactorios, que según las definiciones de la norma ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienist) estas áreas son consideradas como áreas limpias, ya que ninguna de ella superó el recuento de 70 ufc/m³ para bacterias y 40 ufc/m³ de hongos.

No se detectaron microorganismos patógenos que representen un peligro potencial tanto para el análisis de las muestras como para el ambiente.

Este trabajo aporta una información muy valiosa, ya que confirma que las áreas de Laboratorio de Biotecnología y área de Análisis de Alimentos del (I²QB₃), son aceptables para el trabajo rutinario y asegurando la integridad de las muestras y el bienestar del trabajador, por lo cual se esté monitoreo debería realizarse por lo menos dos veces por año.

II. INTRODUCCION

Monitoreo Microbiológico del aire:

El monitoreo microbiológico del aire es un ensayo crítico para garantizar las buenas condiciones del entorno donde se elabora el producto, donde se colocan los accesorios de envasado, tapas, frascos, entre otros y donde se realizan las pruebas bacteriológicas a los productos ya procesados.

Para la toma de muestras se deben establecer previamente los criterios en cuanto a la actividad en sala de producción, turnos a muestrear y sus puntos críticos.

Una vez realizados los muestreos éstos deben ser cultivados en incubadora por 24 horas y el que aislara hongos de 72 horas a 7 días para determinar género y especie del agente microbiológico predominante.

Concluidos los conteos, se estará en condiciones de cuantificar la carga microbiológica comparándola con los valores de tolerancia especificados en la ACGIH vigente para el proceso que se desea controlar.

La carga microbiológica obtenida, permitirá saber si estamos frente a un conteo compatible con una norma de buena práctica de elaboración de análisis para o si se está en presencia de un desvío, que deberá ser corregido inmediatamente, a fin de evitar consecuencias irreversibles en resultado del análisis.

III. JUSTIFICACIÓN

En base a estudios recientes, se ha demostrado que la presencia de ciertas bacterias y hongos, ocasionan contaminación a las muestras, afecciones a los trabajadores y deterioro a los edificios o infraestructura, se hace necesario el monitoreo constante, para determinar el grado de contaminación y el tipo de microorganismos causantes de estas afecciones. Hay que considerar que dentro del sistema de gestión de la calidad este es uno de los aspectos que igualmente brindan mucha información sobre la calidad de las áreas de trabajo.

Por lo cual se hace necesario establecer parámetros de control microbiológico, dentro de las diferentes áreas de trabajo del I²QB₃ y establecer el impacto que tienen estos microorganismos, en el aire interior de los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis de Alimentos de esta institución; siendo de suma importancia la caracterización de las colonias de bacterias y de hongos presentes en el aire interior de estos ambientes y establecer su patogenicidad, para poder establecer medidas correctivas según el diagnóstico del aire, basados en la norma ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienist), la cual indica si las áreas cumplen con los parámetros permisibles para países tropicales) (10^2 ufc/m³); siendo este el que más se asemeja al de nuestro país.

Además de contribuir al monitoreo bianual, establecido por el Sistema de Gestión de Calidad de esta institución.

IV.OBJETIVOS

1. Objetivo General

Monitoreo Microbiológico de aire de los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis de Alimentos del Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas de la Universidad Mariano Gálvez de Guatemala, con el aeroscopio Eco MAS-100.

1.1 Objetivos específicos

- Presencia y recuento de Bacterias y Hongos en el aire interior en las diferentes Áreas de los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis Alimentos.
- Caracterización Primaria (Tinción Gram.) y Secundaria (Pruebas Bioquímicas) de Bacterias presentes en el aire interior de las diferentes Áreas de los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis Alimentos.
- Caracterización Primaria (Identificación Morfológica e Identificación Microscópica con Colorante Azul de Lactofenol) de Hongos presentes en el aire interior de las diferentes Áreas de los Laboratorios Biotecnología y de Análisis de Alimentos.
- Secuenciación genética de ADN con el equipo 3,130 Genetic Analyzer ABYPRISM de 10 colonias de Bacterias y 10 colonias de Hongos; seleccionadas en base a los resultados obtenidos de la caracterización por pruebas primarias y secundarias.
- Apoyo directo al monitoreo del aire en los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis Alimentos, como soporte a la programación bi- anual en el Sistema de la Gestión de la Calidad del I²QB₃ de la Universidad Mariano Gálvez.

V. HIPÓTESIS

1. Hipótesis:

- Detectar presencia de Microorganismos en los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis de Alimentos del Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas.

VI. HIPÓTESIS NULA.

2. Hipótesis Nula:

- No detectar Microorganismos en los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis de Alimentos del Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas.

Hipótesis nula = 0

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo, la parte experimental se realizó por medio de un monitoreo de aire por impactación, utilizando el biocolelector (Aeroscopio) Eco MAS-100, utilizando como soporte de impactación cajas de Agar Tripticasa Soya y Agar Saboraud.

La selección de los puntos de muestreo se realizó en base a la infraestructura, dimensiones de cada uno de los laboratorios y ubicación de los aires acondicionados.

Diez cepas de cada uno de los dos grupos de microorganismos (bacterias y hongos) en estudio fueron llevados a Secuenciación Genética, logrando identificar las mismas por género y especie.

VIII. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Aerobiología

Aerobiología es una rama de la biología que estudia partículas orgánicas, tales como bacterias, esporas de hongos, insectos muy pequeños y polen, las cuales son pasivamente transportadas por el aire. Uno de los principales campos de la aerobiología ha sido el de contar estas partículas como ayuda en el tratamiento de los alérgicos.

Aerobiología es una ciencia en pleno desarrollo, que interactúa con muchas otras ciencias como la ingeniería y la meteorología. La Asociación Panamericana de Aerobiología (PAAA) es una sociedad de individuos que comparten un interés profesional o académico en la ciencia de aerobiología.

2. Estudio Microbiológico del Ambiente

Durante la Segunda Guerra Mundial hubo un gran interés en conocer cómo se propagaban las infecciones respiratorias, especialmente en instalaciones militares estadounidenses y se realizaron numerosos estudios sobre *Streptococcus pyogenes* y *S. pneumoniae*. Un trabajo curioso realizado en esta época, fue el análisis del aire de barcos de guerra, incluidos submarinos, que resultaron relativamente puros.

En términos generales, la aerobiología enfoca el estudio del transporte pasivo de organismos y partículas de origen biológico presentes en el aire de ambientes interiores y exteriores (15).

La aparición, en 1976 en Filadelfia, de una epidemia de una enfermedad respiratoria denominada «de los legionarios» y el conocimiento posterior de una nueva bacteria (*Legionella pneumophila*) como agente etiológico y de su transmisión por aerosoles procedentes del aire acondicionado, supuso un resurgimiento del estudio de los microorganismos que se transmiten por el aire.

La colección de partículas biológicas en el aire es llamada bioaerosol, estos están generados por gotas dispersas o partículas en un rango de diferentes tamaños, desde 0.5 hasta 30 μm y es el aire el que sirve como modo de dispersión de un lugar a otro. Estas partículas biológicas incluyen a las bacterias, esporas fúngicas, algas, virus, protozoos, granos de polen, ácaros y algunos fragmentos de plantas. Dentro de todos ellos las esporas fúngicas y las bacterias ocupan gran parte del material biológico suspendido en el aire, representando los grupos más numerosos, alcanzando concentraciones muy significativas en determinadas épocas del año (16).

De todos los tipos de microorganismos presentes en la atmósfera, las esporas de los hongos (células encargadas de la reproducción) representan el

grupo más numeroso. Estas esporas alcanzan concentraciones muy significativas en determinadas épocas y son las responsables del elevado porcentaje de pacientes sensibilizados a estos aeroalergenos y diagnosticados con problemas de alergia (16).

El segundo grupo de mayor frecuencia en el aire son las bacterias, las cuales dentro del ser humano desencadenan una serie de enfermedades como pueden ser respiratorias, estomacales y pueden ocasionar en caso de infecciones sistémicas la muerte.

Lo anterior condujo a que en la cumbre llevada a cabo en Managua, Nicaragua en el año 1994 del proyecto SIGA se plantearan los siguientes objetivos:

1. Promover la generación y transferencia de tecnologías limpias para mejorar la productividad y desarrollo de estándares técnicos ambientales y estimular la producción sin deterioro del ambiente.
2. Armonizar y modernizar los parámetros ambientales, la legislación y la actuación de las instituciones del Estado y de la iniciativa privada encargadas de la gestión ambiental en Guatemala y en la región de Centroamérica.
3. Reducir los niveles de contaminación del aire, el agua y el suelo.
4. Fortalecer la capacidad de regulación, supervisión y aplicación de un marco normativo y legal relacionado con la gestión ambiental nacional, así como definir en forma consensuada y multisectorial qué es lo que debe considerarse como delito ambiental.
5. Fomentar la discusión nacional y regional de políticas comunes sobre nuevos productos ambientalmente compatibles, sellos verdes y estudios de impacto ambiental. Elaborar un balance de los procesos y funciones que realizan las diferentes instituciones para detectar duplicidades, y traslape de actividades, intercepciones y brechas.
6. Determinar campos de especialidad ambiental para hacer más eficiente la gestión de la calidad ambiental.
7. Sistemas de acreditación y certificación que involucren a los diferentes actores de la gestión ambiental en los procesos de evaluación y control ambiental (14).

3. Importancia de Estudios Ambientales

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. Algunos han creado adaptaciones especializadas que favorecen su supervivencia y permanencia. Los microorganismos dispersados por el aire tienen una gran importancia biológica y económica. Producen enfermedades en plantas, animales y humanos, causan alteración de alimentos y materiales orgánicos y contribuyen al deterioro y corrosión de monumentos y metales. La Microbiología del aire comienza en el siglo XIX, con Pasteur y Miquel que diseñaron métodos para estudiar los microorganismos en el aire y descubrir la causa de algunas enfermedades. Desde entonces numerosos investigadores han trabajado en este campo tanto en el aire exterior como en recintos cerrados. Las enfermedades transmitidas por el aire, producidas por bacterias, virus y hongos, son las respiratorias (neumonía, tosferina, tuberculosis, legionelosis, resfriado, gripe), sistémicas (meningitis, sarampión, varicela, micosis) y alérgicas.

4. Origen de los Contaminantes del Aire

En lo que respecta a la contaminación biológica, su origen se debe fundamentalmente a la presencia de agua estancada, de materiales impregnados con agua o microorganismos, gases, etc., y a un mantenimiento incorrecto de los humidificadores y las torres de refrigeración.

Por último, debe considerarse también la contaminación procedente del exterior, la que contiene polen, esporas fúngicas, bacterias y metabolitos secundarios. Con respecto a la actividad humana, hay tres fuentes principales: la combustión en fuentes estacionarias (centrales energéticas), la combustión en fuentes móviles (vehículos) y los procesos industriales. Algunas de las empresas por un mal manejo de agentes biológicos dentro de algunos procesos son contaminantes microbiológicos del aire

Los sistemas de ventilación y aire acondicionado pueden introducir contaminantes del exterior, a través de sus ductos provocando que los contaminantes circulen de una zona del edificio a otra. Dichos sistemas pueden ser ineficaces a la hora de eliminar o diluir los contaminantes de un edificio.

Los cambios en el estado de una persona debido a la mala calidad del aire interior puede manifestarse en diversos síntomas agudos y crónicos así como en forma de diversas enfermedades específicas, tales como: tuberculosis, neumonía, alergias, rinitis, diarreas, presión en el pecho, irritación en las mucosas, dolor de cabeza y conjuntivitis entre otras (16).

5. Desarrollo Histórico de la Microbiología del Aire

Las esporas de los hongos fueron vistas por un botánico napolitano, Valerius Cordus, en el siglo XVI, pero fue Micheli (1679-1737) quien primero las dibujó observando las esporas de los mohos que se transmitían por el aire (Miquel y Cambert, 1901). Leeuwenhoek (1722) observa y describe por primera vez las bacterias en distintos ambientes posteriormente, Hesse (1884) diseñó un sistema para contar los microorganismos, consistente en un tubo grueso recubierto en su interior de gelatina.

En 1882 demostró que a medida que aumenta la altitud, disminuye el número de microorganismos, en los análisis que realizó desde el tejado del Panteón de París (82 m). Posteriormente, otros investigadores corroboraron esta afirmación. Así, en 1883 y 1884, Freudenreich, estudiando el aire de diversos picos de los Alpes, concluyó que a 300 m hay muy pocos microorganismos y que por encima de 4.000 la pureza era absoluta. También Cristiani en 1893, obtiene los mismos resultados en unos experimentos realizados en globo. Además Miquel, junto con Moreau, estudiaron el aire de diversos mares como Atlántico y Mediterráneo en investigaciones que duraron dos años (1884-86). En ellas observan que el número de bacterias y hongos es alto en las costas, mientras que es prácticamente puro a sólo 100 Km. Miquel y Cambert (1901) afirman que la mayoría son saprofitas y proceden del suelo, encontrando una gran variedad, siendo las más frecuentes las bacterias cromógenas, los bacilos esporulados y los cocos. Resultados semejantes obtuvieron Grace y Frankland (1887) en Londres y Dyar (1895) en Nueva York.

La hipótesis de la existencia de bacterias patógenas en el aire, llevó a Lister en 1867 a la utilización de pulverizaciones del aire con ácido carbónico para evitar la infección de las heridas quirúrgicas, comenzando así la época de la antisepsia en la cirugía. Posteriormente se demostró la presencia en el aire de varias bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc. y que, por tanto, a través de él podían transmitirse enfermedades infecciosas como la escarlatina, tuberculosis, tosferina y rubéola (29).

6. Origen de los Microorganismos

Ehrenberg, en sus memorias publicadas de 1822 a 1858, demostró que tanto las partículas atmosféricas del interior de las casas y hospitales como las del aire exterior de elevadas montañas estaban compuestas de esporas criptogámicas. En esta misma época en Francia, Gaultier de Claubry (1855), inaugura la investigación científica estudiando las partículas atmosféricas mediante un procedimiento que las retiene haciendo borbotear el aire en agua destilada. Pero fue Pasteur el que perfeccionó los procedimientos empleados por este investigador y realizó los primeros estudios precisos de las bacterias del aire, cuando demostró la no existencia de la generación espontánea. El

método utilizado consistió en hacer pasar un volumen determinado de aire con ayuda de un aspirador por algodón-pólvora colocado en un tubo de vidrio, que posteriormente se disolvía en alcohol-éter. En el líquido se depositaban todas las partículas del aire, entre ellas esporas de mohos y de bacterias. En 1862 escribe:

«Hay constantemente en el aire un número variable de corpúsculos cuya forma y estructura anuncian que son organizados. Sus dimensiones se encuentran alrededor de 1:100 mm. Unos son esféricos, otros ovoides, muchos son translúcidos y parecen esporas de mohos» (24).

Muchos microorganismos que viven en la hidrósfera y litósfera pueden encontrarse en el aire. Son microbios autóctonos, procedentes del suelo, agua y seres vivos que pueblan estos ambientes. Los movimientos del aire y de los seres vivos son los que sitúan a los microorganismos en la atmósfera. Junto al suelo hay una capa laminar de aire que impide el fácil paso de microorganismos del suelo al aire. Para que pasen se necesita una fuerte corriente de aire que levante polvo del suelo o agua de sus depósitos (mares, ríos, entre otros). También las plantas los lanzan en sus movimientos de dehiscencia y diseminación (polen, esporas...) y los animales en los actos respiratorios normales y anormales (estornudos, gotas de flügge, entre otros).

A menudo, tanto las esporas como los microorganismos vegetativos entran en la atmósfera como bioaerosoles, que pueden formarse por muchas causas: lluvia, movimiento del agua en los ríos y mar, tratamiento de aguas residuales, aspersores de riego, aire acondicionado o secreciones respiratorias del hombre y de los animales. (29).

7. Número y Distribución de Microorganismos

El número de microorganismos de la atmósfera cambia según la altura (10-104 por m³), obteniéndose el más alto junto al suelo, sobre todo en los dos metros inferiores, que constituyen el microclima del hombre, disminuyen hasta los 200 metros y luego se hacen más escasos hasta los 5.000 metros, su presencia es rara hasta el límite de la troposfera y no se encuentran en la estratosfera. El número de microorganismos del aire en las zonas pobladas depende de la actividad en esa zona, tanto industrial o agrícola, como de los seres vivos y la cantidad de polvo. El número de microorganismos es mayor en las zonas pobladas y después en el mar, cerca de las costas. En las zonas desérticas no hay más que lo que aportan los vientos de las zonas habitables próximas y en los casquetes polares no hay nada. En las zonas con clima seco, el aire contiene numerosos microorganismos y el número desciende después de la lluvia debido a que ésta los arrastra por lavado del aire. Hay variaciones estacionales en el número de microorganismos en la atmósfera. Los hongos son típicamente más abundantes en verano que en el resto del año, mientras que las bacterias son más abundantes en primavera y otoño debido a factores

como la temperatura, humedad relativa del aire, exposición a la luz solar, etc. (16).

8. Supervivencia de los Microorganismos

La supervivencia, reproducción y dispersión en el aire de virus, bacterias, hongos, dependen, en gran medida, de las condiciones del entorno en que se encuentran. Factores tales como la temperatura, la humedad relativa, el movimiento del aire, la luz y las fuentes de alimento, principalmente, van a determinar el grado en que los Microorganismos se encontrarán en el ambiente.

En general, las temperaturas bajas inhiben el crecimiento de muchos microorganismos; no obstante, algunos de ellos (por ejemplo, mohos y levaduras) se desarrollan bien en ambientes fríos. Otras especies microbianas (por ejemplo, *Aspergillus sp*, *Legionella pneumophila* o *Thermoactinomyces vulgaris*), alcanzan su desarrollo óptimo a temperaturas elevadas.

Los ambientes muy húmedos favorecen el desarrollo de los hongos, de las bacterias y de los ácaros del polvo doméstico. El movimiento del aire contribuye al transporte, mantenimiento y paso al aire de los contaminantes biológicos procedentes del exterior o contenidos en un reservorio del interior.

El grado y tipo de luz también pueden favorecer o inhibir el desarrollo de los microorganismos. Por ejemplo, la luz ultravioleta inhibe dicho crecimiento y la ausencia de luz impide la formación de esporas de algunos hongos (*Altemaria sp.*).

Los organismos vivos precisan de nutrientes para su supervivencia y desarrollo; éstos son muy variados pero resumiendo, se podría decir que el agua y la materia orgánica son los dos recursos principales de que se sirven estos organismos para vivir. Por lo tanto, todos aquellos materiales y estructuras en las que se reúnan esas dos condiciones pueden ser considerados como substratos colonizables por los microorganismos. (16)

9. Factores que Contribuyen a la Contaminación Ambiental

Determinadas localizaciones temporales de la tropósfera pueden ser hábitats adecuados para el crecimiento de los microorganismos. Las nubes poseen agua, intensidad de luz y concentración de CO₂ suficiente para permitir el crecimiento de los microorganismos fotoautótrofos. En zonas industriales, puede haber, incluso, la suficiente concentración de sustancias orgánicas en la atmósfera que permita el crecimiento de algunos microorganismos heterótrofos (Atlas y Bartha, 2002). El desarrollo de microorganismos está influenciado por supuesto por factores físicos tales como temperatura, humedad, luz, polvo, aerosoles, viento y turbulencia, pero lo primero que determina que una bacteria

o un hongo se mantenga en el ambiente viable es la cantidad de agua disponible que existe (16).

9.1 Humedad y Temperatura.

La humedad y la temperatura son los factores esenciales para la viabilidad de los microorganismos presentes en suspensión dentro de la atmósfera. Para cada microorganismo se tiene una temperatura y humedad relativa óptima de crecimiento y desarrollo de los mismos por lo cual los valores pueden variar en dependencia de la clasificación de los microorganismos y sus características intrínsecas.

9.2 Ventilación.

La aeración es un factor que incide en el estado de conservación de los objetos presentes en ambientes interiores. Cuando un local está bien ventilado se evapora la humedad y se reduce la temperatura superficial, modificándose estos dos factores ambientales de los que depende el crecimiento del microorganismo.

El aire estancado favorece considerablemente la propagación de los microorganismos, así como su deposición en superficies, alimentos, agua y tierra, mientras que el aire circulante no sólo contribuye a impedir que los microorganismos suspendidos en él se depositen, sino que ayuda a mantener seco el local, de ahí que la ventilación es esencial para lograr una baja actividad biológica en los ambientes internos .

A través de la ventilación se consigue:

- Significativo descenso de la humedad relativa.
- Descenso del contenido de humedad en los objetos.
- Aumento del movimiento de las esporas, las cuales pueden ser transportadas por las corrientes de aire, evitándose así la germinación y el comienzo de su desarrollo.
- Diseminación del riesgo de los procesos de condensación producidos en las superficies frías.

9.3 Polvo.

Entre los elementos que componen la atmósfera tenemos el polvo, que es un factor tóxico en la misma, ya que está siempre cargado de esporas de microorganismos y estas constituyen el componente mayoritario.

Como los componentes del polvo, tanto químicos como biológicos, pueden dañar los materiales, éste debe ser retirado periódicamente para prevenir la contaminación.

El polvo, que tiene componentes biológicos, se deposita sobre los materiales por diferentes vías, siendo una vía de infección cuando las condiciones atmosféricas sean tales que favorezcan el desarrollo de microorganismos.

El polvo contiene huevos de insectos y esporas de microorganismos, sales inorgánicas y trazas de las sustancias volátiles orgánicas que llegan con las evaporaciones acuosas a un substrato adecuado y crean las condiciones favorables, permitiendo el desarrollo de microorganismos.

Se deben tomar cuidados especiales al hacer la operación de limpieza, por el personal en cuestión, ya que pueden ser afectados por los microorganismos patógenos. Esta medida es muy importante y aunque parezca simple es difícil de llevar a cabo y comprender por el personal que debe realizarlo(16).

9.4 Ráfagas de Viento

Son vientos fuertes, repentinos y de corta duración. Pueden formar nubes de poco cuerpo o densidad, especialmente cuando hay o va a haber cambios de tiempo; por ejemplos los aires del Sahara, estos se formaron por el calentamiento del Sahara provocando que el polvo ascienda a la atmósfera superior y atraviese el océano Atlántico con la ayuda de vientos alisios o disturbios climáticos como las ondas tropicales. Aunque una parte de la arena cae al mar, el mayor por ciento se compacta con el aire más húmedo y frío de las capas bajas de la atmósfera, avanzando según informes de la Dirección General de Meteorología .

Este fenómeno contiene partículas nocivas entre las que destacan: pesticidas, microorganismos y otros contaminantes químicos, que inducen a crisis de asma y alergias. Además de la contaminación del aire, las ráfagas de viento sacuden la superficie de las aguas, las rizan y dan lugar a ondulaciones que van creciendo en amplitud. Cuando el viento sopla muy fuerte, las crestas de las olas se cierran sobre sí mismas y caen formando volutas. Los vientos suaves producen aguas calmadas con ondas que pueden recorrer miles de kilómetros, y los vientos fuertes producen aguas tempestuosas (27).

10 .Composición del Aire.

El aire limpio y puro forma una capa de aproximadamente 500 000 millones de toneladas que rodea la tierra, entre sus componentes se encuentran los siguientes:

10.1 Gases:

- 78,9% Nitrógeno
- 21 % Oxígeno
- 0,9% Argón
- 0,003% Dióxido de carbono
- Trazas de muchos otros gases
- Muy bajas concentraciones de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Arango, 2008).

10.2 Vapor de agua condensada:

- Agua libre sólo a intervalos irregulares: lluvia, nubes niebla, etc. (Arango, 2008).

10.3 Polvo:

- Partículas de diferente origen y tamaño que sedimentan a diferentes velocidades. (16)

11 Grupo de Riesgo relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos.

El Real Decreto 664/1997 de 12 de mayo, para la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, clasifica los agentes biológicos en función del riesgo de infección, en cuatro grupos:

11.1 Agente biológico del grupo 1: aquél que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre.

11.2 Agente biológico del grupo 2: aquél que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz.

11.3 Agente biológico del grupo 3: aquél que puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz.; (alto riesgo individual pero bajo para la colectividad).

11.4 Agente biológico del grupo 4: aquél que causando una enfermedad grave en el hombre supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas probabilidades de que se propague a la colectividad y sin que exista generalmente una profilaxis o un tratamiento eficaz; (alto riesgo individual y para la colectividad).

12 Diseminación de los Microorganismos y Enfermedad

La contaminación microbiológica presente en el aire puede provocar irritación en los ojos, la garganta y los pulmones. El ardor en los ojos, la tos y la presión en el pecho son comunes con la exposición a niveles altos de contaminación microbiológica en el aire (Hendrickson, 1999). El aire es vehículo y diseminador de infinidad de enfermedades microbianas tales como:

- Alergias al polen, a los ácaros, a los mohos.
- Toxinas procedentes de mohos (micotoxinas: aflatoxinas, patulina, tricotecenos).
- Toxinas procedentes de bacterias (endotoxinas estafilocócicas y de clostridios).
- Enfermedades provocadas por cepas nosocomiales mutadas: estafilococos, estreptococos, pseudomonas, bacillus).
- Enfermedades víricas (gripe, sarampión, meningitis, resfriados comunes).
- Infecciones fúngicas (aspergilosis).
- Infecciones bacterianas (legionelosis, tuberculosis, tos ferina, difteria, meningitis) (6).

13 Tipos de Microorganismos

13.1 Los virus:

Son las formas de vida más simples. Están constituidas únicamente por material genético: ADN (Acido desoxirribonucleico) o ARN (Acido ribonucleico) y una cápside o cubierta proteica. Son parásitos obligados, es decir, precisan de un huésped para poder reproducirse.

La infección la llevan a cabo inyectando su material genético en las células del huésped. Una vez en su interior se sirven de la maquinaria biológica del huésped para producir copias de sí mismos hasta lograr su total recomposición y en un número tal que rompe las membranas celulares pasando así a infectar nuevas células.

Los virus son microorganismos muy importantes en términos del nivel total de problemas de salud que causan, pero no pueden vivir de forma independiente fuera de células y tejidos vivos.

Aunque existen pruebas que indican que algunos de ellos se desplazan en el aire re circulante de los sistemas CVAA, el principal medio de transmisión es el contacto entre personas.

La inhalación a corta distancia de aerosoles generados al toser o estornudar, como en el caso de los virus del resfriado y de la gripe, también es importante. Por consiguiente, es probable que las tasas de infección sean mayores en situaciones de aglomeración humana.

Tabla No.1. Enfermedades Víricas Transmitidas por el Aire.

ENFERMEDADES VÍRICAS TRANSMITIDAS POR EL AIRE		
Enfermedades	Familia	Género
Resfriado Común	Picornavidae Adenoviridae	Rhinovirus Mastadenovirus
Gripe	Orthomyxoviridae	Influenzavirus
Bronquitis, neumonía	Paramyxoviridae Adenoviridae Bunyaviridae	Pneumovirus Mastadenoovirus Hantavirus
Sarampión	Paramyxoviridae	Morbillivirus
Parotiditis	Paramyxoviridae	Morbillivirus
Poliomielitis	Picornaviridae	Enterovirus
Viruela	Paxviridae	Orttopoxivirus
Varicela	Herpexviridae	Varicellovirus
Rubeola	Togaviridae	Rubivirus
Rabia	Rhabdoviridae	Lyssavirus
Gastroenteritis	Caliciviridae	Rotavirus Virus Norwalk

13.2 Bacterias:

Son microorganismos unicelulares, de forma diferente, hábitat variable, algunas son capaces de formar una envoltura o cápsula, se multiplican por división, otras son capaces de formar endosporas más resistentes a las formas adversas de vida. El oxígeno es indispensable para las bacterias aeróbicas y resulta nocivo para las anaeróbicas que lo toman de compuestos oxigenados. Son capaces de generar mutantes y producir enfermedades por medios tales como: producción de toxinas dañinas para el hombre, las plantas y algunos animales es importante que se conozca las características de cada cepa, lo cual permite la identificación y clasificación de las mismas.

Las bacterias se diferencian por su capacidad de producir ciertas toxinas que son sustancias de naturaleza proteica que dan origen a lesiones o síntomas de su acción característica, al invadir un organismo vivo. Estas toxinas pueden ser excretadas en el ambiente, recirculando en el aire. Entre ellas tenemos las exotoxinas que actúan fuera de la célula bacteriana, esparciéndose en el medio rápidamente y las endotoxinas que permanecen dentro del microorganismo en tanto esté vivo y actúa cuando es alisado y se libera el contenido celular (6).

Las bacterias son organismos más complejos que los virus y a diferencia de ellos son capaces de vivir, en un medio adecuado, sin la necesidad de un huésped para completar su desarrollo.

Es de destacar la capacidad de elaborar esporas que presentan algunas bacterias. Las esporas no son más que formas de vida resistentes a condiciones adversas. Pueden resistir, durante años incluso, altas temperaturas, sequedad, falta de nutrientes y otros, recuperando su estado normal y capacidad infectiva al entrar en contacto con un medio adecuado para su desarrollo.

Es de suma importancia la caracterización de estos microorganismos por su propagación en diferentes ecosistemas como son agua, aire y tierra; permitiendo su fácil expansión, pudiendo provocar daño a nivel de salud, biodeterioro, agricultura y ambiente.

Salmonella spp., es un ejemplo de contaminación en aire la cual, es una bacteria con capacidad de infectar tanto vía alimentaria, animal como ambiental. En estudios anteriores realizados en avícolas se tuvo presencia de *Salmonella spp.*, en muestras de polvo, agua y superficies.

Las bacterias de referencia que pueden ser utilizadas para confirmar la identificación de bacterias aisladas, son cepas que se encuentran perfectamente caracterizadas por diferentes metodologías y conservadas por diferentes técnicas en las cuales permanece con sus características autóctonas intactas. Además, también se utilizan para verificar el cumplimiento de las normas de calidad y demostrar la trazabilidad, el laboratorio debe utilizar cepas de referencia de microorganismos suministrados por una colección nacional o internacional reconocida (14).

Las bacterias se desarrollan con mayor facilidad a pH 7-8 y temperaturas entre 25 y 38°C, aunque muchas especies toleran temperaturas inferiores a 0°C, otras, como las termófilas, resisten más de 45°C. Pueden ser aerobias o anaerobias. También las bacterias producen enzimas y ácidos orgánicos e inorgánicos que están implicados en los mecanismos de deterioro de los materiales que le sirven de sustrato. El contenido de humedad en un material es uno de los factores más importantes en el crecimiento fúngico y bacteriano, y determina la cantidad de agua presente para la germinación de las esporas o conidios microbianos. Muchas especies de hongos y bacterias comienzan su desarrollo en función del contenido de humedad sobre la superficie de un objeto. Una vez formados los micelios fúngicos, servirán para retener agua, favoreciendo a su vez la multiplicación celular. (20)

13.2.1 Géneros bacterianos aislados en el aire

Dentro de los géneros bacterianos encontrados en el aire con frecuencia están *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus* y *Actinomyces* como bacterias Gram positivas, ampliamente relacionadas con cuadros infecciosos de vías respiratorias. De las que no

se encuentran con mucha frecuencia están: *Klebsiella* spp; *Pseudomonas* spp, *Enterobacter* spp, *Citrobacter* sp, *Enterobacter* y *Serratia* spp como bacterias Gram negativas.

- ***Pantoea* sp.**, es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia de las Enterobacterias. Comprende siete especies y dos sub-especies (20).
- ***Bacillus***, es un género de bacterias en forma de bastón y Gram positiva. El género *Bacillus* pertenece a la división Firmicutes. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. La mayoría de especies dan positivo a la prueba de la catalasa y son saprófitas. Viven en el suelo, agua del mar y ríos, aparte de alimentos que contaminan con su presencia. Aunque generalmente son móviles, con flagelos peritricos, algunas especies de interés sanitario (*B. anthracis*, causante del carbunco) son inmóviles. Hay especies productoras de antibióticos.
- ***Serratia*** un bacilo gramnegativo de la familia Enterobacteriaceae. Puede ser peligroso para el hombre, ya que a veces es patógena, como causa de infecciones nosocomiales y urinarias.
- ***Corynebacterium*** es un género de bacterias, bacilos y gram positivos, inmóviles, anaerobio facultativos, pertenecientes al filo actinobacteria. Es uno de los géneros más numerosos de actinobacterias con más de 50 especies, la mayoría no causa enfermedades, sino que son parte de la flora saprófita de la piel humana.
- ***Micrococcus***, es un género de bacterias del filo Actinobacteria. Se encuentran en ambientes diversos, incluyendo agua y suelo. Son bacterias Gram-positivas con células esféricas de diámetro comprendido entre 0,5 y 3 micrómetros que típicamente aparecen en tétradas. *Micrococcus* tiene una gruesa pared celular que puede abarcar tanto como el 50% del materia celular. Su genoma es rico en guanina y citosina (GC), típicamente en porcentaje del 65 al 75% de contenido GC. A menudo contienen plásmidos (de tamaño comprendido entre 1 y 100MDa) que proporcionan al organismo características útiles.
- ***Pseudomonas***, es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones.
- ***Klebsiella pneumoniae***, es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias gramnegativas de la familia *Enterobacteriaceae*, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. El género fue llamado así en honor a Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de finales del siglo XIX. (20)

Tabla No. 2. Enfermedades Bacterianas Transmitidas por el Aire.

ENFERMEDADES BACTERIANAS TRANSMITIDAS POR EL AIRE	
Enfermedades	Generos y especies
Amigdalitis, Faringitis, Bronquitis, Escarlatina	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Difteria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Neumonía Clásica	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Neumonía atípica, bronquitis	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Chlamydia psittaci</i>
Meningitis	<i>Neisseria Meningitidis</i>
Meningitis, epiglotis, neumonía	<i>Haemophilus influenzae</i>
Tosferina	<i>Bordetella pertussis</i>
Tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Legionelosis	<i>Legionella pneumophila</i>
Actinomicosis	<i>Actinomyces israelii</i>
Fiebre Q	<i>Coxiella burnetii</i>
Carbunco pulmonar	<i>Bacillus anthracis</i>
Peste	<i>Yersinia pestis</i>

13.3 Hongos:

Son organismos evolutivamente más desarrollados que las bacterias. Poseen filamentos llamados hifas que forman el micelio visible en la superficie de los objetos. Su desarrollo óptimo se establece a un pH entre 4-6, humedades relativas superiores a 70 % y temperaturas entre 22-30°C. Los hongos al igual que muchas especies bacterianas, producen pigmentaciones de diferentes tonalidades, como resultado de los productos que excretan. En su metabolismo se producen enzimas tales como la celulasa o diferentes tipos de proteasas y ácidos orgánicos (acético, cítrico, láctico, glucónico, glucurónico, fumárico, oxálico), los cuales interfieren con los componentes del soporte modificando sus propiedades químicas y físicas.

Los hongos son formas complejas de vida que presentan una estructura vegetativa denominada micelio que está formada por hifas. Esta estructura vegetativa surge de la germinación de sus células reproductoras o esporas.

Su hábitat natural es el suelo, pero algunos componentes de este grupo son parásitos tanto de hombres y animales como de vegetales.

13.3.1 Hongos Microscópicos

Los hongos tienen un metabolismo aeróbico obligado por lo que pueden degradar fácilmente las proteínas complejas con enzimas proteolíticas. Entre estas proteínas se encuentran el colágeno y la elastina, principales constituyentes del tejido conectivo de animales y humanos (Lehninger, 2001), siendo una de sus características patogénicas tanto en animales como en plantas y biodeteriorante. El crecimiento de los hongos es probable si la actividad del agua (a_w) del material oscila entre los valores de 0.76-0.96 (dependiendo de la especie fúngica), temperatura, tiempo y composición del material. (20)

Aspergillus es un género de hongo filamentoso ubicuo, productor de enfermedades de distribución universal que ocasionalmente pueden aparecer en forma de brotes hospitalarios tras obras de remodelación. Este género es un ejemplo de lo que denominamos "patógeno oportunista", (Alcalá et al., 1999). El pequeño tamaño de los conidios de algunos hongos permite su aspiración y fácil penetración al tracto respiratorio, causando infección en el pulmón y en los senos paranasales.

Algunos hongos producen patulina, citrinina, lovastatina, monacolina J, monacolina L, y mevastatina, obteniéndose estas últimas en mayor proporción con el incremento en la concentración de glutamato e histidina (Hendrickson et al., 1999; Kennedy et al., 1999).

Las esporas de *Curvularia* son comunes en la atmósfera y tienden a ser miembros especialmente importantes de los bioaerosoles de áreas tropicales. Sin embargo, poco se conoce sobre las actuales proteínas alergénicas, de ahí que se asuma su poder alergénico y además se plantea que puede ser una causa de sinusitis por hongos (16).

Además de su carácter invasivo poseen la habilidad de ser microorganismos biodeteriorantes, afecta principalmente a los materiales orgánicos e inorgánicos por ejemplo la corrosión biológica de los metales, materias primas y materiales manufacturados. (Sánchez, 1989). El biodeterioro realizado por los microorganismos ocurre siempre y cuando las condiciones de crecimiento (nutrientes, temperatura, humedad, pH y aireación) sean contribuyentes.

En Guatemala el biodeterioro es mucho más agudo ya que la temperatura generalmente oscila en un rango de 25 °C a 35 °C y una humedad relativa (HR) por encima del 70%, por lo que estas condiciones son altamente conducentes para el crecimiento de microorganismos, fundamentalmente los hongos, colocando al patrimonio cultural en alto riesgo de biodeterioro (16).

13.3.2 Géneros Fúngicos Microscópicos Aislados en el Aire

Los hongos ambientales se encuentran tanto en el exterior como en el interior de los domicilios. A pesar de que las diferencias entre la concentración de elementos fúngicos presentes en espacios cerrados y ambientes abiertos es controvertida, se acepta que los niveles de hongos en el exterior están muy condicionados por las variaciones climáticas, y esto también influye en la diversidad de los hongos del interior.

Cada región geográfica puede presentar una flora fúngica atmosférica diferente, dependiente, en gran medida, de las condiciones climáticas; así, en Europa y Norteamérica, *Penicillium* y *Cladosporium* son los géneros más abundantes en ambientes interiores. *Cladosporium*, además, junto con *Alternaria*, se considera un moho fundamentalmente de exterior (16).

La mayoría de los géneros aislados de la atmósfera son considerados alergénicos. No obstante, algunos de ellos, como *Alternaria*, *Cladosporium* y *Aspergillus*, aparecen como los más importantes.

- ***Cladosporium*** pertenece a la familia-forma *Demaciáceas* (Orden forma *Moniliales*, Subdivisión *Deuteromycotinas*) que engloba a unas 40 especies, algunas de ellas fitopatógenas y la mayoría saprofitas sobre vegetación o sobre el suelo; algunas de sus especies son capaces de atacar celulosa, pectina y lignina. Algunas de sus especies actúan como oportunistas.
- ***Alternaria***, es un hongo que se encuentra en alimentos, tejidos, así como en diferentes tipos de suelo. Tiene tendencia a habitar en sustratos orgánicos en descomposición. Puede provocar lesiones cutáneas y subcutáneas después de traumatismos en personas con inmunosupresión. *Alternaria alternata* es uno de los hongos más extensamente distribuidos y uno de los principales alérgenos.
- ***Fusarium***, es un extenso género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. La mayoría de las especies son saprofitas. Algunas especies producen micotoxinas en los cereales y que pueden afectar a la salud de personas y animales si estas entran en la cadena alimentaria. La principal toxina producida por estas especies de

Fusarium son fumonisinas y trichothecenos. Son patógenos facultativos, capaces de sobrevivir en el agua y suelo alimentándose de materiales en descomposición. Son importantes agentes de contaminación en los laboratorios de microbiología.

- ***Aspergillus***, es un género de alrededor de 200 hongos (mohos), es un hongo filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas), el hábitat natural del *Aspergillus* son el heno y el compostaje. Es un hongo oportunista. Entre las patologías más frecuentes se encuentran:

- ✚ Aspergilosis pulmonar invasiva: especialmente importante en inmunosuprimidos.

- ✚ Onicomycosis: enfermedad de las uñas.

- ✚ Otomicosis: enfermedad principalmente del oído externo.

- ✚ Sinusitis alérgica.

Es relativamente frecuente confundir una infección por *Aspergillus* con las más comunes infecciones bacterianas, así como puede haber una infección simultánea con ambos microorganismos (16).

14 Aeroscopios y sus Inicios

Durante la epidemia de cólera que apareció en Europa en 1847 y 1848. Ehrenberg en Berlín, Swagne, Brittan y Budd en Inglaterra, Robin y Pouchet en Francia, realizaron diversas investigaciones para descubrir en el aire de los hospitales los «gérmenes» causantes de esta enfermedad (Miquel y Cambert, 1901). También en la siguiente epidemia de cólera, Thompson (1855) intentó descubrir el agente causante utilizando el método de Claubry, observando vibrios y mohos. Otros investigadores como Selmi en Italia y Salisbury en EEUU (1866), estudiaron el aire de los pantanos con el fin de conocer la causa de la fiebre intermitente y la malaria. El método que usaron estos primeros investigadores fue muy simple: consistía en explorar el aire con un portaobjetos con un líquido viscoso como la glicerina.

El aeroscopio sustituyó con ventaja a estos métodos. Inventado por Pouchet en 1860, consistía en un tubo grueso cilíndrico unido por uno de sus extremos a una tubuladura por el cual se aspiraba el aire, y por el otro extremo se colocaba una lámina de vidrio recubierta de una sustancia viscosa como glicerina, que podía observarse al microscopio. Cunningham lo reformó en 1872 y Miquel lo unió a una veleta y posteriormente a una bomba aspiradora para poder realizar análisis cuantitativos (1879). Hesse (1884) diseñó un sistema para contar los microorganismos, consistente en un tubo grueso recubierto en su interior de gelatina. El aire penetraba mediante un tubo unido a un aspirador a través de un orificio realizado en

la membrana de caucho que recubría un extremo del tubo. A partir de este aparato, Miquel diseñó un modelo más práctico consistente en un matraz cónico con una tubuladura lateral, por la que entraba el aire a través de un tubo capilar inmerso en un medio de gelatina.

Pierre Miquel fue sin duda el investigador que más estudió los microorganismos del aire, en el observatorio de Montsouris en París, desde 1879 y durante más de 25 años, realizó numerosos ensayos creando y perfeccionando una gran variedad de métodos. Además del aeroscopio, empleó un procedimiento basado en el fraccionamiento de los cultivos para determinar el número de hongos y bacterias, consistente en dirigir el aire en tubos de bolas y posteriormente (1880), en un matraz de borboteo, conteniendo líquidos nutritivos estériles.

A partir de 1882 se generalizan los análisis microbiológicos del aire, estudiándose el número y tipo presentes en diversos ambientes. Miquel fue el que realizó los estudios más numerosos y variados. Analizó tanto el aire confinado de casas y hospitales como la atmósfera de diversas calles de París, de los parques, el cementerio de Mont Parnasse, e incluso las alcantarillas. No sólo determinó el número por m³ presente en cada uno de estos ambientes, sino su naturaleza y propiedades patógenas, así como la influencia de los diversos factores (temperatura, lluvia, corrientes de aire, altitud, número de personas, etc.) y la posibilidad de transmisión por el aire de enfermedades contagiosas (16).

El uso de este método permite la separación de partículas del torrente de aire utilizando la inercia de las mismas para forzarlas a su deposición en una superficie sólida ó semisólida. La superficie de colecta es generalmente un medio de cultivo agarizado o un portaobjetos de vidrio cubierto de una sustancia adhesiva, aunque se pueden utilizar medios líquidos.

Este método se lleva a cabo a través de equipos llamados bio colectores que absorben un volumen de aire definido. El objetivo de utilizar un bio colector es la remoción y colección de partículas biológicas del aire de manera que no afecte la integridad biológica de los microorganismos colectados. La capacidad de colección de estos equipos depende de su forma física y de las características fisiológicas del microorganismo (16).

15 Métodos de Muestreo.

15.1 Gravitación o Impactación Natural:

Es la forma más simple de toma de muestra de bioaerosoles, en la cual las partículas biológicas aerotransportadas son recogidas sobre una superficie adherente (agar en una placa Petri o recubriendo un

portaobjetos, placas RODAC,...) por su capacidad de sedimentar por gravedad.

Es un procedimiento útil para estudios iniciales y para la estimación aproximada de la carga microbiológica tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo, si se eligen adecuadamente los medios de cultivo. (28).

Este método se lleva a cabo a través de equipos llamados biocolectores que absorben un volumen de aire definido. El objetivo de utilizar un biocolector es la remoción y colección de partículas biológicas del aire de manera que no afecte la integridad biológica de los microorganismos colectados. La capacidad de colección de estos equipos depende de su forma física y de las características fisiológicas del microorganismo .

Entre los biocolectores por impacto se incluyen al impactador por hendidura o rendija Aeroscopio y el Burkard (ambos emplean un sólo orificio generalmente rectangular para la entrada de aire), el Surfase Air Sampler (SAS) de tipo criba (emplea varios orificios, usualmente de forma circular) y el Andersen (de 3 y 6 estadios) de tipo cascada (emplea numerosas etapas con sucesivos pequeños orificios).

15.2 Centrifugación:

Estos muestreadores de impactación utilizan la fuerza centrífuga para ayudar a la separación de las partículas de la corriente de aire de aspiración. Operan creando un remolino en el cual las partículas con suficiente inercia dejan la corriente de aire para impactar sobre la superficie (medio de cultivo) de recogida.

15.3 Filtración:

El aire es aspirado a través de un medio de filtración en el cual las partículas se depositan. El tipo de filtro más utilizado es el de membrana de policarbonato ya que las partículas pueden ser removidas fácilmente de su superficie por agitación en líquidos adecuados, procediéndose a la posterior inoculación de la suspensión formada en los medios de cultivos específicos.

16 Cuando Realizar el Monitoreo de Aire

Los monitoreos de rutina deben realizarse para asegurar que los requerimientos estándares son alcanzados y alertar si se está fuera de los

límites apropiados para protección del producto que está siendo fabricado u analizado. La identificación periódica del límite de especies debe ser garantizado por aislamiento microbiológico para garantizar, si el resultado del Monitoreo es atípico que es cuando el tipo de colonia es de diferente forma a lo normal, cuando el límite de acción es excedido o si el aislamiento es sospechoso de ser objetable.

Las acciones correctivas y preventivas tomadas, deben ser documentadas. La investigación debe completarse dentro de un periodo de tiempo razonable.

El periodo de re-evaluación para los límites, debe ser definido en el protocolo de validación, éste periodo no debe exceder de un año.

Los resultados del programa de monitoreo ambiental para revisar que no impactan al lote que va a ser liberado.

Aplica para los muestreos microbiológicos del aire con recuento de microorganismos aeróbicos, y hongos o levaduras, en cabinas de seguridad biológicas, áreas biolimpias, salas blancas, y/o de contaminación controlada(16).

17 El plan del Programa de Monitoreo debe Considerar

- Regulaciones locales.
- El tipo de materiales y productos manejados y las operaciones realizadas.
- Monitoreo de partículas viables y no viables.
- Monitoreo de aire, superficies y personal.
- Requerimientos de temperatura y/o humedad.

18 Requisitos que deben Incluir en el Programa.

- Responsable del muestreo, análisis, documentación y evaluación de los datos.
- Identificación del tipo de Monitoreo, métodos y ubicaciones.
- Frecuencia de Monitoreo.
- Identificación periódica a nivel de especie, deben realizarse de microorganismos aislados de servicios en contacto con el producto, para establecer una línea base de los aislamientos ambientales.
- Identificación a nivel de especie deben realizarse, si se exceden los límites de acción.
- Cuando un resultado excede el límite de acción o especificación, se deben de tomar acciones correctivas y/o preventivas. Todas las investigaciones de la causa raíz (1)
- La NOM-059-SSA1 vigente y normas internacionales.

19 Normativa

Con relación a los niveles de contaminación permisibles en el ambiente:

La Organización Mundial de la Salud es un ejemplo de estas normas. Se han establecido criterios técnicos como el valor límite umbral de la conferencia Americana de Higienistas Industriales del Gobierno (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH) de Estados Unidos y los valores límite legalmente establecidos para ambientes industriales en diferentes países, para los trabajadores adultos y para duraciones específicas de exposición que, por lo tanto, no pueden aplicarse directamente a la población general.

La ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienist) en 1989 publicó una guía (*Bioaerosols: Assessment and Control*) en la que se incluían como recomendación los siguientes valores:

- Conteo total de hongos en suspensión <500 ufc/m³
- Conteo total de bacterias en suspensión <500 ufc/m³

Según la norma internacional el nivel máximo permisible de contaminación para ambientes interiores en países fríos es de 500 ufc/m³ y en países tropicales esta en el orden de 10² ufc/m³, y en ambientes exteriores es de 10³ ufc/m³. (1)

20 Clasificación de los Ambientes según la Contaminación.

- ✚ Ambiente muy limpio: < 10 ufc/m³
- ✚ Ambiente limpio : 10 a 100 ufc/m³
- ✚ Ambiente aceptable : 100 a 200 ufc/m³

21 Cálculo de Resultados

21.1 Feller's:

El número total de microorganismos contados (UFC), se modifica basado en la tabla de corrección estadística de Feller's, la cual está basada en la posibilidad que varios microorganismos entren por el mismo orificio en la tapa perforada a medida que existan más microorganismos en el ambiente a muestrear.

$$Pr = N \times \sum_{x=0}^{r+1} \left(\frac{1}{N-x} \right)$$

Pr = es el número esperado de partículas viables para producir r orificios positivos.

N = es el número total de orificios de la placa (300)

Una mejor alternativa de cálculo es la siguiente donde:

r = es el número de colonias bacterianas en la placa del instrumento de muestreo.

N = es el total de orificios de la tapa, a través de la cual se dispara el aire del área que se muestrea, en dirección a la Petri con el medio de cultivo.

Los números de orificios suelen ser: 200, 300, 400.

Ejemplo: N= 300 r= 150 colonias

$$Pr = 300 * \ln((300 \square 0.5) / (300 \square 150 \square 0.5)) = 207.4$$

La tabla de Feller da el valor: 207 lo cual es obviamente un resultado de redondeo de cifras pues, como las partículas bacterianas no constituyen una variable continua sino Poissoniana, es prácticamente imposible que salgan resultados enteros. (16)

21.2 UFC/m³:

El resultado corregido que se obtiene de la Tabla de Feller's de UFC/ml de aire absorbido, es pasado a UFC/m³, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/m}^3 = \text{UFC/ml} \times 1000 \text{ ml/100 Lt de aire} \times 1\text{Lt/1m}^3$$

22 Periodicidad de los Monitoreos de Aire

Al momento de hacer los controles semestrales o anuales, resulta imprescindible controlar la carga microbiológica del aire (UFC/m³) como también la concentración de partículas por metro cúbico, integridad de filtros HEPA, renovaciones de aire por hora, temperatura y humedad, a fin de evaluar distintos aspectos que hacen a la calidad de aire y evaluar el comportamiento del sistema en su conjunto.

23 Equipo Muestreador Microbiológico de Aire Eco MAS-100 (Aeroscopio)

El aeroscopio Eco MAS-100 (Figura 1) es un dispositivo pequeño, y práctico utilizado en la toma de muestras de aire capaz de aspirar diferentes volúmenes de aire en determinada cantidad de tiempo. Además es un equipo de centrifugado de aire ambiental, que a través de un cabezal, permite el impacto del aire en una placa de Petri de 90 mm de diámetro, pre llenado con el cultivo seleccionado para la búsqueda de bacterias Gram negativos, Gram positivos u hongos. Este equipo debe ser calibrado periódicamente y las muestras analizadas por laboratorios reconocidos, con el fin de asegurar la fiabilidad del ensayo. Ideal para el muestreo de aire en la industria de alimento y de bebidas,

Su uso esta descrito en el manual MAS-100 Eco "Qualification of air sampler systems: The MAS 100 Meier R. und Zingre H, Swiss Pharma 1-2/00

Figura 1: Equipo Eco MAS-100 (Aeroscopio).



23.1 Especificaciones técnicas del equipo Eco MAS-100:

- Velocidad de Flujo: 100 litros por minuto \pm 2,5 %,
- Cabezal de muestreo: Diámetro: 10,9 cm Utilizan placas Petri de 90 mm.
- Volúmenes de muestreo estándares: 50, 100, 250, 500, 1000 litros, ajustables individualmente.
- Volúmenes preseleccionados, Conforme a ISO 14698-1/2.
- Se adapta perfectamente al concepto HACCP (análisis de riesgos y puntos críticos de control).

24 Secuenciador Genético de ADN 3,130 Genetic Analyzer ABYPRISM

El Sistema Applied Biosystems 3130 es un Analizador Genético de ADN mediante electroforesis capilar totalmente automático desde la carga de la muestra hasta su análisis, que dispone de un sistema automático de llenado y alineamiento de los 4 capilares, de inyección automática y de software de análisis específico. El equipo totalmente controlado por ordenador, utiliza la técnica de marcaje del DNA con múltiples fluorocromos y es capaz de realizar Secuenciación de ADN, Análisis de Fragmentos y Genotipado con los programas de Applied Biosystems. (3)

El sistema consta de: Unidad de Electroforesis Capilar con placa de calentamiento capaz de controlar la temperatura desde 18°C hasta 65°C.

Fuente de alimentación que controla la tensión hasta 20.000 voltios.

Un detector simultáneo de distintas emisiones de fluorescencia con capacidad de detección de hasta 5 fluorocromos.

Unidad óptica compuesta por un laser de argón iónico con potencia de 10mV y con líneas espectrales de 488 nm y 514,5 nm.

Unidad de detección compuesta por cámara CCD que recoge en multi-frecuencia todas las emisiones de fluorescencia de 514 a 680 nm. detectando todo el espectro de emisión de cada uno de los marcadores fluorescentes.

Sistema de excitación de doble haz óptico, que compensa la diferencia de energía a lo largo de los 4 capilares y proporciona así una mayor sensibilidad en la detección de las distintas emisiones de fluorescencia en todas y cada una de las muestras.

Un Soporte electroforético de arrays de 4 capilares de 50 micras, de, 36 cm., 50 cm., y 80. cm que se rellenan de forma automática con los mismos polímeros tanto para secuenciación como para análisis de fragmentos, utilizando polímero: POP-4 o POP-6.

Cargador automático de muestras compuesto por una bandeja de 96 pocillos y un sistema automático de inyección electrocinética de los fragmentos de ADN.

Un sistema de control de temperatura de los capilares que asegura la máxima reproducibilidad, esencial para muchas aplicaciones como en la técnica de AFLP's.

Ordenador PC con procesador Pentium 4, 2GHz., sistema operativo Windows XP, 1GB de RAM, dos discos duros de 36 GB, Monitor color de 17 pulgadas, unidad lectora CD-ROM (40x), unidad grabadora de CD's, tarjeta Ethernet e impresora color. (3).

AB 3130 Genetic Analyzer (Figura 2) incluye el control del sistema y el análisis de los datos que se realiza mediante los programas cargados en una WorkStation en Windows XP lo que permite que el equipo funcione sin intervención del usuario de forma automática y continuada durante las 24 horas alcanzando una capacidad de procesamiento de muestras mayor de 144 secuencias ó 144 análisis de fragmentos diarios. (3)

Figura 2: AB 3130 Genetic Analyzer



25 Secuenciación de Cepas.

La secuencia nucleotídica exacta de un fragmento de DNA permite un conocimiento más completo de la estructura y función de un gen.

El equipo de secuenciación cuenta con un dispositivo que permite captar la emisión de luz de los cuatro dideoxinucleótidos. La lectura se hace entonces partiendo de las secuencias más cortas hasta la secuencia completa, y se genera un gráfico con picos de emisión de luz en la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia de interés (cromatograma). Se utiliza propiedades refractivas de los capilares y polímero para minimizar la pérdida de señal a través de los capilares.

El Software 3100 Data Collection ABI PRISM, versión 1.0.1, admite el Conjunto de fluorocromos DS-30 y los Linkage Mapping Sets ABI PRISM LD20, MD10 y HD5.

Conjunto de fluorocromos para Data Collection DS-30 son 6-FAM (azul), HEX (verde), NED (amarillo) y ROX (rojo). Los fluorocromos fluorescentes se detectan con diferentes eficacias.

26 Medios de Cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones nutritivas necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme; por ello, la variedad de medios de cultivo es también grande, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos. En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados. En general, la preparación de un medio de cultivo se reduce simplemente a pesar la cantidad deseada del mismo y redissolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante para posteriormente esterilizarlos. Antes de su esterilización, los medios de cultivo ya hidratados se distribuyen en los recipientes adecuados (tubos o matraces; según se trate de caldos o agares). (3)

26.1 Diferentes medios de cultivo.

26.1.1 De acuerdo a su consistencia tenemos:

26.1.1.1 Medios líquidos: habitualmente nombrados caldos, y que están contenidos en tubos de cultivo.

26.1.1.2 Medios sólidos o, generalmente llamados agares; precisamente por contener este componente que se utiliza como agente gelificante (alrededor del 5%), para dar la solidez a ese tipo de medios de cultivo. Generalmente contenidos en cajas de petri.

26.1.1.3 Medios semisólidos: que contienen también agar (alrededor del 1%), y este les da una consistencia como natilla. Generalmente contenidos en tubos de cultivo.

26.1.2 De acuerdo a su utilidad tenemos:

26.1.2.1 Medios generales: permiten el desarrollo de una gran variedad de microorganismos.

26.1.2.2 Medios de enriquecimiento: favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo, sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento del resto.

26.1.2.3 Medios selectivos: permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás.

26.1.2.4 Medios diferenciales: son aquellos en los que se ponen de relieve propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee. (26)

27 Identificación de Bacterias

27.1 Caracterización bacteriana.

Se debe corroborar la correcta identificación para lo cual se emplean medios de cultivo selectivos que contiene un determinado sustrato o inhibidor, luego se lleva a cabo la siembra del microorganismo y se incuba para poder visualizar el crecimiento y la degradación de un sustrato, ya sea por viraje de un indicador, o de algún producto de su degradación. Posteriormente se debe realizar las pruebas secundarias y terciarias con las cuales se puede determinar el género, grupo de géneros, familia o en algún caso especie a la que pertenecen.

Junto con la aplicación de las pruebas de caracterización a las cepas en estudio, se realizan las mismas pruebas a las cepas de referencia que darán la confirmación de la caracterización y la validación de la metodología. Las cepas de referencia deben ser reconstituidas y sembradas, utilizando medios de cultivo y condiciones de incubación indicadas en las disposiciones para cada tipo de microorganismo, por el proveedor de las cepas (26).

Se determina la forma de las colonias, color morfología; en el Gram del microorganismo en estudio, se determina la agrupación y la presencia de esporas y otras características morfológicas de interés.

Las colonias que sean Gram positivas (+) se les realizara la prueba s de Coagulasa y Catalasa, catalogando hasta género y se realizo una resiembra en Agar Manitol sal.

Las colonias que sean Gram negativas (-) realizar Pruebas Bioquímicas utilizando los medios; TSI, LIA, MIO, CIT, UREA y La prueba de Oxidasa. (10)

28. Material de Referencia.

Estas cepas o material de referencia, se utilizaron como controles positivos, tanto para Bacterias como para Hongos, garantizando así la calidad de los resultados.

Eligiendo las mismas en base a las recomendaciones del (BAM), siendo esto los géneros patógenos de mayor importancia en la Industria de Alimentos.

- ✚ ***Escherichia coli*** (ATCC=25922)
- ✚ ***Salmonella typhi.*** (ATCC= 14028)
- ✚ ***Estafilococo aureus*** (ATCC= 27840)
- ✚ ***Listeria monocytogenes.*** (ATCC=15313)
- ✚ ***Penicillium citrinum*** (CBS =139.45)

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Equipo Utilizado: Tabla No.3.

Aeroscopio Eco MAS-100	Incinerador para asas de nicromo
Asas de nicromo en argolla y en punta hilo	Incubadora
Autoclave	Micro centrífuga refrigerada
Balanza Analítica	Micro pipetas automáticas
Baño María	Microscopio con cámara
Bio Photometer Plus	Pipetas
Baño en Seco	Pipetas Pasteur
Cajas para almacenar eppendorf de 2 ml	Plato caliente en seco
Cámara de Quebec	Potenciómetro
Campana de Flujo Laminar	Refrigeradora de 4°C a 8°C
Centrifuga	Secuenciador 3,130 Genetic Analyzer ABYPRISM
Congelador de – 20°C	Termociclador
Equipo para Electroforesis	Termómetros
Gradillas para eppendorf	Transiluminador
Horno	Vortex

B. Reactivos:**Tabla No.4.**

Aceite de Inmersión	EDTA 0.5M
Agar Citrato	Formamida
Agar LIA	Kit de limpieza de PCR
Agar MacConkey	Kit de purificación de Hongos
Agar Manitol Sal.	Kit de purificación de Bacterias
Agar Nutritivo	Lugol
Agar Saboraud	Medio MIO
Agar Trypticosa Soya	MicroSeq 500 16S rDNAPCR Kit Bacterias
Agar TSI	MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal
Agar Urea	Peróxido de hidrógeno al 30%
Agarosa	Plasma humano
Agua Ultra Pura.	PrepMan Ultra
Etanol Grado Reactivo	Reactivo de KOVAC'S
Alcohol Acetona	Safranina
Azul de Lacto fenol	Suplemento de Urea
Bromuro de Etidio	TAE 50X
Cristal Violeta	Escalera de 500 pares de bases
Discos para Oxidasa	Loading dye

C. Consumibles:**Tabla No.5.**

Algodón	Guantes de Nitrilo
Cajas de Petri de 90 mm	Mascarillas N 95
Septas	Papel Para Film
Papel térmico transiluminador	Puntas amarillas de 1-30 ul y 1- 100 ul sin filtro
Placas ópticas	Puntas azules 100 a 1000 ul sin filtro
Puntas de 10 - 100 µl con filtro	Puntas de 100-1000 µl con filtro
Puntas de 10-30µl con filtro	Puntas de 0.1 - 10µl con filtro para pipeta
Tubos eppendorf de 0.2 mL libres de ADN y RNAsas	Tubos eppendorf de 0.5 mL libres de ADN y RNAsas
Tubos eppendorf de 1.5 mL libres de ADN y RNAsas	Papel Kraf

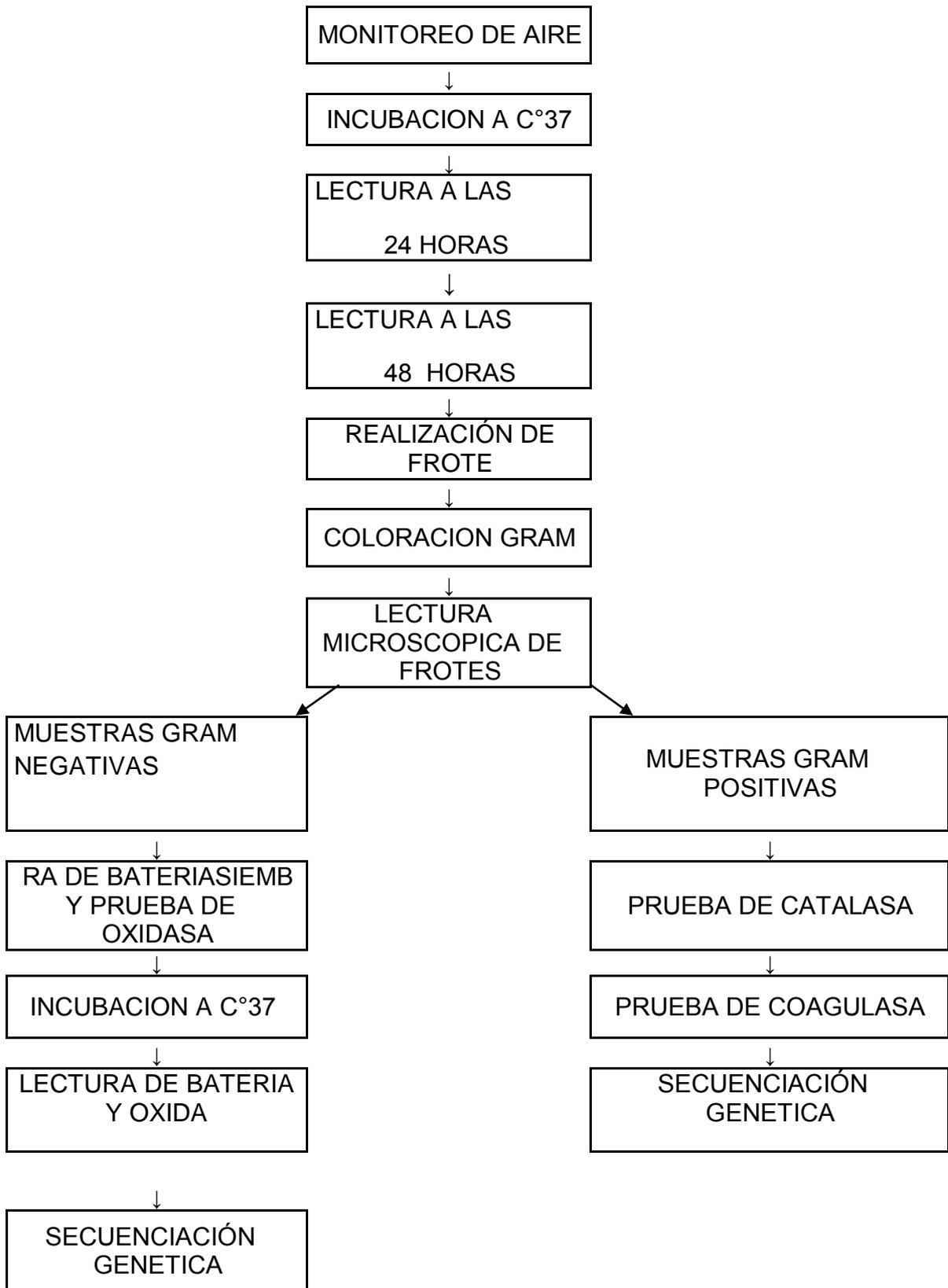
D. MÉTODOS:

1. Método Observación Macroscópica.
2. Método de Tinciones: Gram y Azul de Lactofenol.
3. Método de Pruebas Bioquímicas: batería, oxidasa, coagulasa y catalasa.
4. Método de Secuenciación Genética : Didexoi (Sanger 1977)

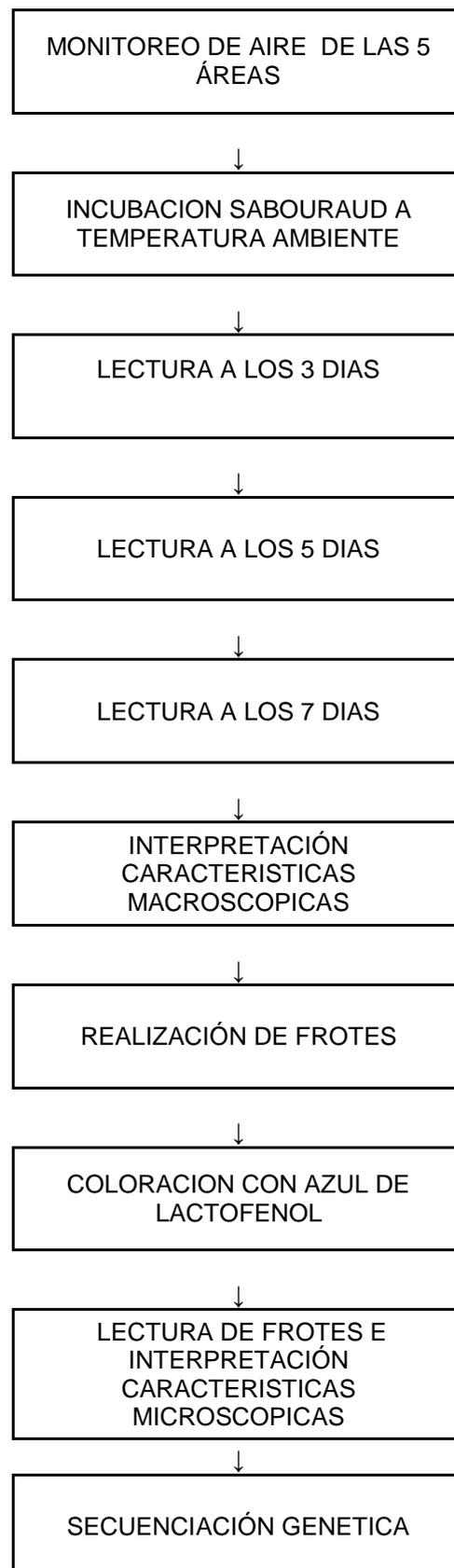
La Identificación de Bacterias se basa en la secuenciación del fragmento 16S del de ARN ribosomal.

La Identificación de Mohos y levaduras mediante secuenciación del ADN del fragmento D2 que codifica para la subunidad mayor del ribosoma.

X. FLUJOGRAMA PARA BACTERIAS



XI. FLUJOGRAMA PARA HONGOS



XII. PARTE EXPERIMENTAL.

1. Muestreo con el Aeroscopio MAS-100 Eco

1.1 Carga de batería del Aeroscopio:

Recargar la batería con el cargador suministrado con el Aeroscopio MAS-100 *Eco*. Un ciclo de recarga completo de la batería dura 9 horas.

El rendimiento del volumen aspirado es de aproximadamente 18,000 litros, lo que corresponde a unas 180 mediciones por cada 100 litros.

1.2 Toma de muestra de aire:

- Colóque el Aeroscopio Eco MAS-100 *Eco* en el punto de muestreo.
- Desinfecte el cabezal y la base donde se coloca la caja.
- Colóque la caja de petri.
- Programe en el equipo el volumen de aire que desea absorber (va depender de las dimensiones del local), este puede ajustarse o modificarse individualmente dentro de los seis volúmenes con los que cuenta el equipo. (20Lt, 50 Lt, 100 Lt, 200 Lt, 250 Lt, y 500 Lt). En las áreas del Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas se uso un volumen de 100 L/min.
- Posicione el equipo en el ángulo de muestreo deseado.
- Comience la toma de muestra presionando “Start”, en el menú.
- Al terminar retire el cabezal, cierre la caja de petri con su correspondiente tapa y extraiga la misma del equipo de muestreo.
- Desinfecte nuevamente la base donde se coloca la caja de petri, así como el cabezal y el guardapolvo. Una vez finalizado el proceso de desinfección coloque el cabezal en el equipo de muestreo así como el guardapolvo.
- El equipo esta listo para ser usado nuevamente dentro del mismo monitoreo de aire.

1.3 Incubación de Medios de Cultivo

Las cajas de Petri con Agar Tripticasa Soya se incuban a 37 °C por un período de tiempo que va desde 24 a 48 hrs, según el crecimiento que presente cada una de las cajas. Las cajas con Agar Sabouraud se incuban a temperatura ambiente o 28 °C por 7 días, en los cuales se les realiza un monitoreo de crecimiento microbiológico a los 3, 5 y 7 días de incubación.

1.4 Aislamiento de Cepas

Se seleccionan las colonias bacterianas y fúngicas a aislar por medio de la morfología macroscópica. Una vez realizada la selección se procede a sembrar cada una de ellas en Agar Nutritivo para bacterias y Agar Saboraud para hongos.

1.5 Caracterización Bacteriana

El proceso de Caracterización se inicia realizando un análisis macroscópico de las colonias (Anexo No.1), seguido de la realización de frotis y su correspondiente tinción. (Anexo No. 2)

Posteriormente se realiza pruebas bioquímicas entre las que se encuentran: Bateria y Oxidasa para las Gram Negativas (Anexo No.3) y Catalasa para las Gram Positivas. (Anexo No. 4)

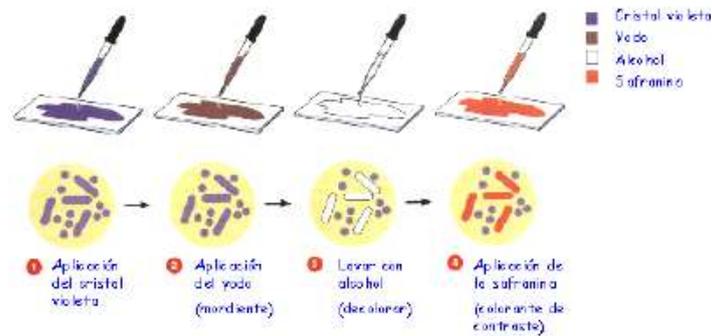
Por último se seleccionan las cepas bacterianas que van a ser llevadas al proceso de Secuenciación Genética. (Anexo No.5 y No.6)

1.5.1 Frote Bacteriano y Tinción de Gram:

- Colocar una gota de agua estéril en un portaobjetos.
- Tomar con un asa en hilo, una asada de una colonia bacteriana bien aislada.
- Hacer un extendido del frotis bacteriano.
- Dejar secar a Temperatura ambiente y fijar a la llama.
- Cubrir el frotis con solución Cristal Violeta y dejar por un minuto.
- Lavar con abundante agua corriente y escurrir.
- Cubrir con solución de Lugol durante un minuto.
- Lavar con abundante agua corriente y escurrir.
- Gotear alcohol acetona sobre la preparación hasta que deje de soltar color violeta.
- Lavar con abundante agua corriente y escurrir.
- Cubrir la lámina con Solución de Safranina, durante un minuto.

- Lavar con abundante agua corriente y escurrir.
- Dejar la lámina, ligeramente inclinadas para que terminen de escurrir y sequen a temperatura ambiente.

Pasos de la coloración de Gram



1.5.2 Observación de las Láminas al Microscopio

- Enfocar la lámina en el microscopio en el objetivo de 10X (Seco Débil).
- Pase al Objetivo de 40X (Seco Fuerte), sin mover el tornillo macrométrico y afine la imagen.
- Agregar una gota de aceite de inmersión sobre el frotis bacteriano.
- Pase al objetivo de 100X (Inmersión) y afine la imagen.
- Defina en base a lo observado, el grupo al que pertenece la bacteria observada y su morfología microscópica.

1.5.3 Pruebas Bioquímicas (Oxidasa y Bateria) para Bacterias Gram Negativas

1.5.3.1 Siembra de Bateria

- Rotular cada juego de tubos de **TSI, LIA, MIO, CIT, UREA**, con el código que posee cada bacteria aislada.
- Escoger una colonia bien aislada, tomar la colonia con un asa en hilo esterilizada previamente y sembrar de la siguiente manera:
 - **TSI** un pinchazo sin llegar al fondo y luego estriado en el Sland.
 - **LIA** tres pinchazos sin llegar al fondo y luego estriado en el Sland.
 - **MIO** pinchazo recto sin llegar al fondo.

- **CIT** solo estriado en el Sland.
 - **UREA** solo estriado en el Sland.
- Incubar las baterías durante un período de 24 hrs a 48 hrs, según crecimiento y reacción observada.

Interpretar los resultados obtenidos en la batería utilizando la tabla que se muestra en el (Anexo No.7)

➤ **Prueba de Oxidasa**

- Con una pinza estéril tome un disco de Oxidasa y colóquelo sobre un portaobjetos estéril.
- Con un asa en argolla estéril tome una colonia de la caja de aislamiento y colóquela frotándola sobre el disco de Oxidasa.
- Interprete los resultados en base al cambio de color que se observe en el disco de Oxidasa.



Oxidasa (-)



Oxidasa (+)

1.5.4 Prueba Bioquímica (Catalasa) para Bacterias Gram Positivas

1.- Con una aguja de punción o un aplicador de madera con la punta aguzada transferir células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjetos.

2.- Añadir 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3% . Se recomienda no añadir el organismo al reactivo (invirtiendo el orden), especialmente si se utilizan agujas o asas que contienen hierro, ya que se pueden producir resultados falsos positivos.

1.5.5 Interpretación: La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva. Dado que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas de la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno, unas pocas burbujas diminutas formadas a los 20 a 30 segundos no se consideran una prueba positiva.

Se uso como control positivo *S. aureus* , para garantizar su eficacia.

1.5.6 Prueba de Coagulosa en Porta Objeto.

- 1.- Coloca una gota de agua destilada o solución salina fisiológica estéril sobre un portaobjetos.
- 2.- Emulsionar suavemente una suspensión del organismo en estudio en la gota de agua utilizando un asa o una varilla.
- 3.- Coloca una gota del plasma junto a la gota de la suspensión bacteriana. Mezclarlas bien.
- 4.- Inclinar el portaobjetos hacia uno y otro lado, observando la formación inmediata de un precipitado granular o de grumos blancos.

1.5.7 Interpretación.

Una reacción positiva se detecta usualmente en 15 a 20 segundos por la aparición de un precipitado granular o la formación de grumos blancos. La prueba se considera negativa si no se observa aglutinación en 2 o 3 minutos.

1.6 Secuenciación de Bacteria y Hongos.

1. A partir de la colonia aislada, tomar una asada y transferir a un tubo de 1.5 ul con el reactivo Pre Man Ultra y digerir.
2. Coloque el tubo y déjelo 3 minutos en un bloque seco a 100 °C .
3. Centrifugar.
4. Trasladar el sobrenadante a un tubo limpio.
5. Cuantifique el ADN extraído en el BioPhotometer Plus.
6. Preparar diluciones acorde a la concentración del ADN extraído
7. Pipetee 15ul de PCR MasterMix en cada tubo de reacción de PCR agregue 15 ul de la dilución de ADN extraído al tubo correspondiente a cada muestra, igual para una muestra positiva y una muestra negativa.
8. Coloque los tubos en el Termociclador y Seleccione el programa de Termociclador correspondiente según sea Bacterias u Hongos.

Tabla No.6. Termociclado

Paso Inicial	30 Ciclos			Extensión Final	Paso Final
	Fusión	Alineación	Extensión		
HOLD	CICLO			HOLD	HOLD
95°C 10 Min	95°C 30 Sec	60°C 30 Sec	72°C 45 Seg	72°C 10 Min	4°C ∞

9. Una vez culminado el PCR la secuencia debe ser limpiada para eliminar los restos de primer y posibles inhibidores de la reacción de secuencia con el Kit de limpieza Quiagem.
10. Realice un segundo PCR para secuenciación marcando por cada muestra 2 tubos uno F “forward” y uno con R “Reverse”.
11. Coloque los tubos en el Termociclador y Seleccione el programa de Termociclador correspondiente.

Tabla No.7. Segundo Termociclado

25 Ciclos			Paso Final
Fusión	Alineación	Extensión	
CICLO			HOLD
96°C	50°C	60°C	4°C
10 Sec	5 Sec	4 Minutos	∞

12. Una vez terminado el Termociclado puede almacenar los tubos la refrigeradora (4°C) durante la noche, en el congelador (-20°C) durante una semana o más tiempo o continuar el procedimiento.
13. Realizar la limpieza de secuencia utilizando el método proporcionado por la casa comer de Quiagem.
14. Realice la secuenciación en el equipo GENETIC ANALAYCER 3130, según método descrito por la casa comercial.
15. Realice las lecturas de los electroferogramas, dependiendo si corresponden a las bacterias o a los hongos, utilizando el Software de Micro SeqID de la casa Applide Biosystems.
16. Imprima los resultados correspondientes a cada una de las identificaciones.

XIII. RESULTADOS

1. Resultados de UFC/m³ de Bacterias Obtenidas en las Diferentes Áreas.
Tabla No. 8.

Nombre del Área MUESTREO	Agar Agar T. Soya/24 hrs	Agar T. Soya/ 48 hrs	Total Σ de 24 horas y 48 horas	UFC/ML= Σ Col/4 cajas	Total de UFC/ML por área	Total de UFC/M3 por área
Área Blanca (Área 1)						
Punto 1 ₁	3	5	14	4	7	70
Punto 1 ₂	3	3				
Total	6	8				
Punto 2 ₁	5	1	12	3	7	70
Punto 2 ₂	3	2				
Total	8	3				
Área Gris (Área 2)						
Punto 1 ₁	3	1	5	1	5	50
Punto 1 ₂	1	0				
Total	4	1				
Punto 2 ₁	6	4	17	4	5	50
Punto 2 ₂	4	3				
Total	10	7				
Área Negra 1 (Área 3)						
Punto 1 ₁	3	2	13	3	5	50
Punto 1 ₂	1	7				
Total	4	9				
Punto 2 ₁	5	3	9	2	5	50
Punto 2 ₂	1	0				
Total	6	3				
Área Negra 2 (Área 4)						
Punto 1 ₁	1	0	5	1	3	30
Punto 1 ₂	2	2				
Total	3	2				
Punto 2 ₁	0	1	6	2	3	30
Punto 2 ₂	2	3				
Total	2	4				
Alimentos (Área 5)						
Punto 1 ₁	1	2	8	2	3	30
Punto 1 ₂	3	2				
Total	4	4				
Punto 2 ₁	0	1	2	1	3	30
Punto 2 ₂	1	1				
Total	1	1				

2. Resultados de UFC/M3 de Hongos Obtenidas en las Diferentes Áreas.

Tabla No. 9.

Nombre del Área MUESTREO 25/04/2012	Agar Saboraud/ 3 días 27/04/2012	Agar Saboraud/ 5 días 30/04/2012	Agar Saboraud/ 7 días 02/05/2012	Total Σ de 24 horas y 48 horas	UFC/ML= Σ Col/4 cajas	Total de UFC/ML por área	Total de UFC/M3 por área
Área Blanca (Área 1)							
Punto 1 ₁	3	2	0	7	2	4	40
Punto 1 ₂	2	0	0				
Total	5	2	0				
Punto 2 ₁	5	0	0	8	2	4	40
Punto 2 ₂	3	0	0				
Total de Σ de 2 puntos	8	0	0				
Área Gris (Área 2)							
Punto 1 ₁	1	0	0	5	1	4	40
Punto 1 ₂	1	3	0				
Total de Σ de 2 puntos	2	3	0				
Punto 2 ₁	4	3	0	11	3	4	40
Punto 2 ₂	3	1	0				
Total de Σ de 2 puntos	7	4	0				
Área Negra 1(Área 3)							
Punto 1 ₁	2	0	0	3	1	3	30
Punto 1 ₂	0	1	0				
Total de Σ de 2 puntos	2	1	0				
Punto 2 ₁	2	0	0	7	2	3	30
Punto 2 ₂	4	1	0				
Total de Σ de 2 puntos	6	1	0				
Área Negra 2 (Área4)							
Punto 1 ₁	1	1	0	4	1	2	20
Punto 1 ₂	2	0	0				
Total de Σ de 2 puntos	3	1	0				
Punto 2 ₁	2	1	0	5	1	2	20
Punto 2 ₂	1	1	0				
Total de Σ de 2 puntos	3	2	0				
Alimentos (Área 5)							
Punto 1 ₁	7	0	0	10	0	4	40
Punto 1 ₂	3	0	0				
Total de Σ de 2 puntos	10	0	0				
Punto 2 ₁	1	1	0	3	1	4	40
Punto 2 ₂	1	0	0				
Total de Σ de 2 puntos	2	1	0				

3. Resultados de Cepas Bacteriana y de Hongos, obtenidos en el Secuenciador Genético.

Tabla No.10. Resultados de Bacterias Obtenidos en el Secuenciador Genético.

CORRELATIVO	Código de la Bacteria	RESULTADO EN EL SECUENCIADOR	RESULTADO GRAM
1	AF	<i>Pseudomonas oryzihabitans*</i> (ATCC=43272)	NEGATIVA
2	AI	<i>Staphylococcus hominis novobiosepticus</i> (ATCC=7002)	POSITIVA
3	AK	<i>Bacillus subtilis subtilis</i> (ATCC=6051)	GRAM VARIABLE
4	AM	<i>Staphylococcus warneri</i> (ATCC=27836)	POSITIVA
5	AN	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (ATCC=17588)	GRAM VARIABLE
6	F	<i>Acinetobacter genomoespecies</i> 3*(ATCC=17922)	NEGATIVA
7	G	<i>Kocuria kristinae*</i> (ATCC=27570)	POSITIVA
8	K	<i>Staphylococcus kiosii</i> (ATCC=43959)	POSITIVA
9	P	<i>Staphylococcus capitis capitis</i> (ATCC=27840)	POSITIVA
10	R	<i>Paenibacillus pabuli*</i> (ATCC=43899)	LEVADURA

Tabla No.11. Resultados de Hongos Obtenidos en el Secuenciador Genético.

CORRELATIVO	Código de Le'l Hongo	RESULTADO EN EL SECUENCIADOR	RESULTADO AZUL DE LACTOFENOL
1	HA	<i>Ascochyta fabae</i> (CBS=524.77)	<i>Ascochyta fabae</i>
2	HB	<i>Cladosporium cladosporoides</i> (DSM=62121)	<i>Cladosporium cladosporoides</i>
3	HD	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CBS =316)	<i>Cladosporium</i> sp.
4	HE	<i>Penicillium citrinum</i> (CBS =139.45)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
5	HH	<i>Aureobasidium pullulans</i> (CBS =584.75)	<i>Aureobasidium pullulans</i>
6	HI	<i>Chaetomium globosum</i> (CBS =149.6)	<i>Chaetomium globosum</i>
7	HJ	<i>Penicillium oxalicum</i> (DSM =898)	<i>Penicillium oxalicum</i>
8	HK	No se envió a secuenciación	<i>Cladosporium</i> sp.
9	HL	No se logró la secuenciación	<i>Penicillium</i> sp.
10	HM	No se envió a secuenciación	<i>Aspergillus</i> sp.
11	HN	<i>Penicillium citrinum</i> (CBS =139.45)	<i>Penicillium citrinum</i>
12	HÑ	No se logró la secuenciación	No se logro identificar

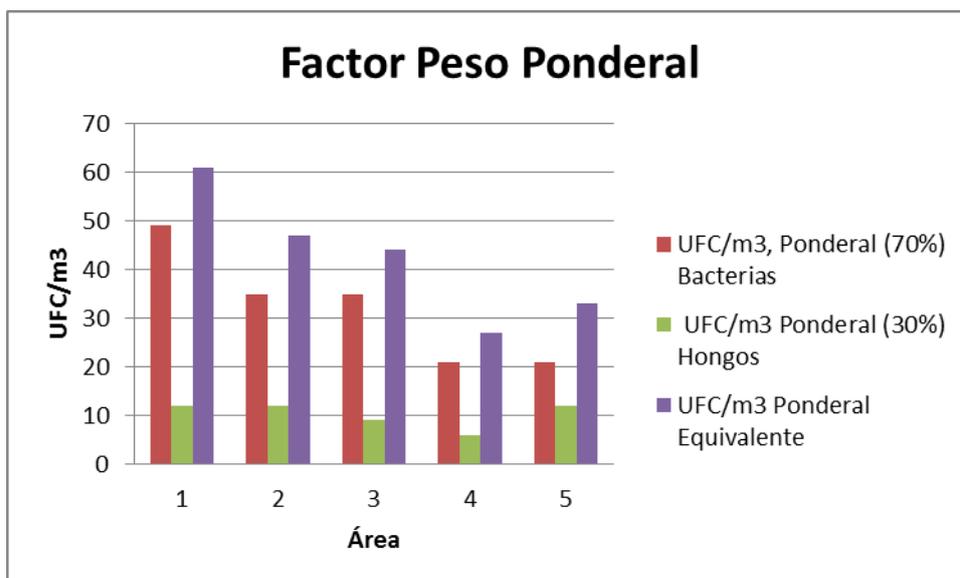
4. Resultado del Total de UFC/m³ por área:

	Bacterias UFC/m3	Hongos UFC/m3
• Área 1 =	70	40
• Área 2 =	50	40
• Área 3 =	50	30
• Área 4 =	30	20
• Área 5 =	30	40

Tabla No 12. Factor Peso Ponderal:

ÁREAS MONITOREADAS	BACTERIAS (UFC/m ³)	HONGOS (UFC/m ³)	UFC/m ³ , Ponderal (70%) Bacterias	UFC/m ³ Ponderal (30%) Hongos	UFC/m ³ Ponderal Equivalente
1	70	40	49	12	61
2	50	40	35	12	47
3	50	30	35	9	44
4	30	20	21	6	27
5	30	40	21	12	33

Gráfica No. 1



XIV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Cuando el recuento de las colonias bacterianas y hongos es superior a 20 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), debe ser corregido, de acuerdo a la Tabla de valores según fórmula Feller 1950 (Anexo No. 8) debido a que este valor posee un error estadístico por los múltiples orificios que posee la tapa metálica del equipo de monitoreo del aire, por lo que es necesario corregir los valores utilizando la fórmula en mención:

$$Pr = N [1/N + 1/N-1 + 1/N-2 + 1/N - r + 1]$$

Pr: total estadístico probable. N: constante. r: número de unidades formadoras de colonias contadas en cajas de Petri de 90mm.

El recuento de las colonias en las cajas de Petri con agar Tripticasa Soya, se realizó después de 24 horas y/o 48 horas de incubación a 37°C. El valor que se obtuvo esta en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), estos valores no fueron corregidos, debido a que el recuento menor fue de 7 (UFC/ml).

El valor de UFC/L la carga bacteriana y fúngica presente en el aire en cada una de las áreas, se uso la fórmula siguiente para convertirla en unidades formadoras de colonias por metro cúbico (UFC/m³):

$$\text{UFC/ml} \times 1000 \text{ ml} / 100 \text{ Lt de aire absorbido} \times 1000 \text{ Lt} / 1 \text{ m}^3 = \text{UFC/m}^3$$

2. Se encontró presencia de Microorganismos (Bacterias, Hongos y Levaduras) en el área de los Laboratorios de Biotecnología y de Análisis de Alimentos, los cuales de acuerdo a la identificación obtenida en base a la secuenciación y según información de literatura no son de capacidad virulenta, considerándolos únicamente como oportunistas.
3. Se encontraron en un número aceptable de **UFC/m³**, según La ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienist), los resultados corresponden a una clasificación de Ambiente de Área Limpia ya que el valor máximo obtenido fue de 70 UFC/m³, para Bacterias y 40 UFC/m³, para Hongos.

4. Con respecto a la identificación de las Bacterias, esta fue efectiva, ya que la calidad del ADN y su concentración, no altero la lectura de la secuencia, cumpliendo con las observaciones de la casa matriz, del Software Micro SeqID, la cual indica que se debe partir de una buena calidad de ADN, para obtener un buen resultado.
5. Con respecto a la identificación de las Hongos, esta fue efectiva, para 7 de las 10 cepas aisladas, ya que la calidad del ADN y su concentración fue efectiva sólo para 10 cepas; logrando una completa identificación únicamente por 7 géneros diferentes y uno repetido. Debido a que la madurez de las colonias no permitió una adecuada extracción, dificultando de esta forma la identificación de dos de las diez colonias elegidas para dicho fin. Esto igualmente lo recomienda el protocolo de la casa matriz del Software Micro SeqID.
6. Dentro de las cepas aisladas con el medio de cultivo Saboraud, y en base a la observación macroscópica y microscópica fue identificada como levadura, de igual forma la confirmo la secuenciación genética, ya que la calidad del ADN fue efectiva para dicho propósito.
7. Todos los resultados con respecto a la clasificación de las Bacterias, Hongos y Levaduras, según la revisión bibliográfica, se consideran oportunistas y únicamente causarían daño a los trabajadores, si se encontraran en condiciones deficientes del sistema inmunitario

XV. CONCLUSIONES

1. De acuerdo a La ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Higienista), por el recuento de microorganismos encontrados en las áreas de los Laboratorios de Biotecnología y los laboratorios de Análisis de Alimentos, fueron clasificadas como ambiente de Área Limpias.

2. Todos los microorganismos identificados, corresponden a la clasificación de Microorganismos Oportunistas.

3. De las 10 Cepas Bacterianas elegidas, para la identificación, por medio de la metodología de secuenciación genética, todas pudieron ser identificadas con la biblioteca del Software de Micro SeqID.

4. De las 10 cepas de Hongos elegidas, para la identificación, por medio de la metodología de secuenciación genética, solamente se pudieron identificar 8, con la biblioteca del Software de Micro SeqID.

5. Este estudio contribuyo en forma efectiva al monitoreo de aire del (I²QB₃) según su programación dentro del Sistema de Gestión de la calidad.

XVI. RECOMENDACIONES

1. Debido a que los microorganismos aislados e identificados, en este estudio fueron patógenos oportunistas, que se presentan en forma ocasional en el aire, se recomienda no descuidar las buenas prácticas de laboratorio (calidad de la limpieza, el control de ingreso, manejo adecuado de muestras, entre otros) para un buen manejo de los productos a procesar.
2. En base a los resultados obtenidos, con respecto a la calidad de ADN de Hongos, se recomienda hacer nuevos aislamientos y nuevas extracciones de ADN, para llegar a establecer el tiempo óptimo de crecimiento en cual nos dé al final una adecuada concentración, para el proceso de secuenciación genética.
3. Es necesario que exista respetabilidad en estos procesos, para monitorear el apareciendo de otros microorganismos en estas áreas de los laboratorios.
4. Contar con profesionales comprometidos, que trabajen bajo estrictos controles de calidad y con controles certificados que aseguren la fiabilidad y trazabilidad de los ensayos

XVI. BIBLIOGRAFIA

1. American Conference Governmental Industrial Hygienist-ACCGIH- (1989). Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment Cincinnati, American Conference of Governmental Industrial Hygienist p. 110.
2. Applied Biosystems MicroSeq. ID Analysis Software Version 2.0 Getting Started Guide.
3. Applied Biosystems. ABI Prism. 2003. Manual Protocol de Procesamiento 2005. USA.
4. Applied Biosystems. MicroSeq 500, 16S rDNA Bacterial Identification Kits. Protocol. 2005. USA.
5. Applied Biosystems. MicroSeq D2 LSU, rDNA Fungal Identification Kits. Protocol. 2005. USA.
6. Arenas R. (1993) Micología Medica Ilustrada, Clinica, laboratorio y terapéutica. Mexico: Editoria Mc Graw – Hill S.A.397 pp.
7. Barnett, H. L.Hunter, B.B. (1987) Ilustred genera of Imperfect Fungi 3 Edition Burgess Publishing Co. Minnapolis P.190.
8. Barrientos, A. Prácticas de Microbiología 1. Universidad Mariano Gálvez. Facultad de Ciencias Médicas. 2008.
9. Butnert, P.M. y Stetzenbach L.D. (1991) Evaluación of four aerobiological sampling
10. Campollo, E. Prácticas de Microbiología 1. Universidad Mariano Gálvez. Facultad de Ciencias Médicas. 2005.
11. Castro G. J. Aquino, C. (2000). Manual sobre conservación bacteriana. México:Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
12. Dopazo A. Hervés M, Aira M.J (2001). Concentración de esporas de *Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium* en la atmósfera de Santiago de Compostela (1996). Botánica Complutenses.
13. Durán, A. (2003). Calidad de aire interior. Biopress. No. 8 Diciembre.
14. Eagle Industrial Higiene Associates. (2004) Microbial Sampling and Analysis: Molds and bacteria
15. Harrison J, Pickerin C.A.Faragher E.B. Qustwick P.K. Little S.A. Lawton I. (1992) An investigation of relationship between microbial and particulates indoor air pollution and the sick building syndrome *Respire Med*; 86:225-35.

16. Herrera K. Estudio Micológico del Aire en Áreas Ocupacionales y Exteriores de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y otras áreas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
17. <http://www.edicion-micro.usal.es/Web/educativo/micro2/tema 06.htm>
18. <http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/Seminario medios. htm>
19. Jay, J. M. (2002) Microbiología Moderna de los Alimentos 4ta Ed Acribia Zaragoza España.
20. methods for the retrieval of aerolized Pseudomona. Appl. Environ. Microbiol. 57:1268-1270.
21. Número de Recuento en Placas NRP (1987) Análisis higiénico Sanitario y ambientales Método de ensayo microbiológicos.
22. Organización Mundial de la Salud, OMS. (1997). Guía para la calidad del aire. Trad Centro Panamericano de ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS/OPS)Ginebra Suisa.
23. Pelezar, Reaid, (1993) Microbiología. Cuarta Edición Editorial Mc Graw – Hill Mexico.
24. PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent Protocol. 2005.
25. Rodriguez, C. Manual de Medios de cultivo. Centro de Preparado (BIOCEN); 2001:200
26. Rojas T.I, Martínez (1998) Micobiota contaminante en ambientes interiores. Trabajo para optar el Título de Maestro en Ciencias Facultad de Biología, Universidad de la Habana Cuba. microbiano.
27. Rojas T.I, Martínez (2000) Monitoreo microbiano del aire: Criterios metodológicos. Contribución a la educación y protección ambiental Vol. I: 110- 115.
28. Sarabariego S. (2003) Estudio Aerobiológico del polen y las esporas de la atmosfera de Almeria; modelos de pronóstico e incidencia de sensibilización en la población atópica. Rev Iberoanm Micol 21: 121-127
29. Campollo, E. Prácticas de Microbiología 1. Universidad Mariano Gálvez. Facultad de Ciencias Médicas. 2005.
30. Barrientos, A. Prácticas de Microbiología 1. Universidad Mariano Gálvez. Facultad de Ciencias Médicas. 2008.
31. Herrera K. Estudio Micológico del Aire en Áreas Ocupacionales y Exteriores de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y otras áreas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

32. American Conference Governmental Industrial Hygienist-ACCGIH- (1989). Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment Cincinnati, American Conference of Governmental Industrial Hygienist p. 110.
33. Durán, A. (2003). Calidad de aire interior. Biopress No. 8 Diciembre.
34. Eagle Industrial Higiene Associates. (2004) Microbial Sampling and Analysis: Molds and bacteria, <http://www.eagleih.com/micro.html>.
35. Jay, J. M. (2002) Microbiología Moderna de los Alimentos 4ta Ed Acribia Zaragoza España.
36. Organización Mundial de la Salud, OMS. (1997). Guía para la calidad del aire. Trad Centro Panamericano de ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS/OPS) Ginebra Suiza.
37. http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/Seminario_medios.htm.
38. http://www.edicion-micro.usal.es/Web/educativo/micro2/tema_06.htm.
39. http://www.bvssan.incap.org.gt/bvs_incap/E/Publica/Docs/piloto/03%20-%20Ap%C3%A9ndice%202.pdf

XVII. APENDICE

Fotografías

- a. Áreas del Laboratorio de Biotecnología y Laboratorio de Análisis de Alimentos.

Laboratorio de Biotecnología.

Área 1 = Área Blanca



Área 2 = Área Gris



Área 3 = Área Negra 1



Área 4 = Área Negra 2.



Laboratorio de Análisis de Alimentos

Área 5 = Área de Análisis de Alimentos.



B. Proceso : Toma de muestra, Cultivo y Aislamiento de microorganismos, en las áreas monitoreadas

Toma de Muestra.



Cultivo.



Lectura de aislamientos para bacterias



Lectura de aislamientos para hongos.



c. Pruebas Bioquímicas.

Prueba de Coagulosa.



Prueba de catalasa.



Pruebas Bioquímicas.



d. Crecimiento y Aislamiento de Cepas de Hongos.

Área 1 = Área Blanca



Área 2 = Área Gris



Área 3 = Área Negra 1



Área 4 = Área Negra 2

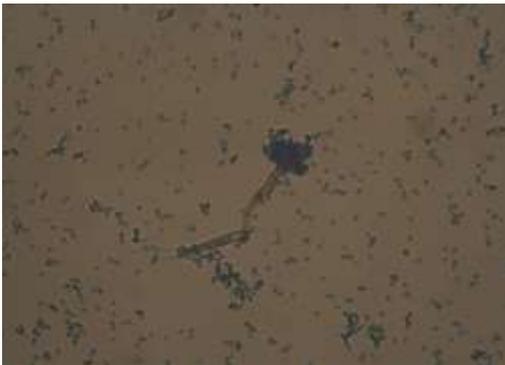


Área 5 = Área de Análisis de Alimentos.

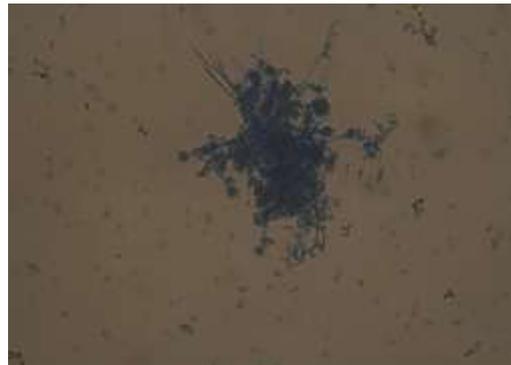


e. Microscópicas de algunos Hongos Aislados.

HM. *Aspergillus sp.*



HL. *Penicillium sp*



Cepa No Identificada



H.H Aureobasidium



f. Morfología Macroscópica de algunos Hongos Aislados.

Penicillium sp.



Aspergillus sp.



Cepa No Identificada



XVIII. ANEXOS

Anexo No.1 CARACTERIZACION MACROSCOPICA DE MICROORGANISMOS.

Lectura de Características Macroscópicas de Bacterianas Aisladas.

CEPA AISLADA	Area y Punto	Código de la Bacteria	Color	Forma	Tamaño	Prop. Ópticas				Tipo de Borde o Margen					Elevación		Pigmento	Consistencia	
						Opaca	Translúcida	Transparente	Brillante	Entero	Ondulado	Lobado	Ondulado	Filamentoso	Sí	No			
1	1 punto 1	A	Crema	Redonda	1 mm				X	X						X	NO	Humeda	
2	1 punto 1	B	Crema	Redonda	3 mm				X	X						X	NO	Humeda	
3	1 punto 1	C	Crema	Redonda	0.5 mm		X			X						X	Amarilla/ MS	Chiclosa	
4	1 punto 1	D	Beige	Redonda	3 mm				X	X						X	NO	Chiclosa	
5	1 punto 1	E	Beige	Redonda	3 mm			X		X				Umbilicada			NO	Humeda	
6	1 punto 1	F	Crema	Puntiforme	4.0 mm				X		X			Cupula			NO	Chiclosa	
7	1 punto 1	G	Crema	Redonda	0.2 mm		X			X				Acuminada			NO	Chiclosa	
8	1 punto 2	H	Beige	Filamentosa	3 mm	X				X							NO	Dura y Seca	
9	1 punto 2	I	No se recupero aislamiento																
10	1 punto 2	J	Crema	Redonda	1.0 mm				X	X						X	NO	Humeda	
11	1 punto 2	K	Blanca	Redonda	2.0 mm				X	X						X	NO	Dura y Seca	
12	1 punto 2	L	Amarilla	Rizoide	5.0 mm	X						X		Planoconve			NO	Dura y Seca	
13	1 punto 2	M	Amarilla	Puntiforme	3.0 mm			X	X	X					X	Amarilla/ MS	Chiclosa		
14	1 punto 2	N	Amarilla	Rizoide	3.0 mm				X				X	Acuminada		Amarilla/ MS	Chiclosa		
15	2 punto 1	Ñ	No se recupero aislamiento															NO	Humeda
16	2 punto 1	O	Blanca	Redonda	1.0 mm			X	X	X						X	NO	Chiclosa	
17	2 punto 1	P	Blanca	Redonda	0.5 mm			X		X						X	Amarilla/ MS	Chiclosa	
18	2 punto 1	Q	Amarilla	Redonda	1.5 mm				X	X				Cupula		Amarilla/ MS	Humeda		
19	2 punto 1	R	Crema	Irregular	2.0 mm				X		X			Umbilicada			NO	Seca	
20	2 punto 2	S	Crema	Redonda	2.0 mm		X				X				X		NO	Chiclosa	
21	2 punto 2	T	Blanca	Redonda	0.1 mm	X				X				Acuminada			NO	Chiclosa	
22	2 punto 2	U	Crema	Redonda	3.0 mm	X				X				Umbilicada			NO	Humeda	
23	2 punto 2	V	Amarilla	Rizoide	4.0 mm	X						X		Planoconve		Amarilla	Humeda		
24	2 punto 2	W	Amarilla	Rizoide	2.0 mm	X						X		Acuminada			NO	Dura y Seca	
25	3 punto 1	X	Amarilla	Fusiforme	2.0 mm				X		X					X	NO	Humeda	
26	3 punto 1	Y	Blanca	Redonda	0.1 mm		X			X						X	NO	Dura y Seca	
27	3 punto 1	Z	Amarilla	Redonda	1.0 mm				X	X						X	Amarilla	Humeda	
28	3 punto 2	ZZ	Crema	Redonda	1.5 mm		X		X	X						X	NO	Dura y Seca	
29	3 punto 2	Aa	Amarilla	Fusiforme	1.0 mm		X		X	X						X	Amarilla	Dura y Seca	
30	3 punto 2	AB	Crema	Redonda	1.5 mm				X	X						X	NO	Chiclosa	
31	3 punto 2	AC	Amarilla	Redonda	1.0 mm				X	X						X	Amarilla/ MS	Humeda	
32	3 punto 2	AD	Blanca	Redonda	1.0 mm				X	X						X	NO	Humeda	
33	3 punto 2	AE	Blanca	Redonda	2.0 mm				X	X						X	Amarilla/ MS	Dura y Seca	
34	3 punto 2	AF	Amarilla	Rizoide	1.0 mm	X						X		Acuminada			NO	Dura y Seca	
35	4 punto 1	AG	Blanca	Redonda	2.0 mm				X	X						X	Amarilla/ MS	Humeda	
36	4 punto 2	AH	Crema	Redonda	2.0 mm		X		X	X						X	Amarilla	Humeda	
37	4 punto 2	AI	Crema	Redonda	2.0 mm	X				X						X	NO	Dura y Seca	
38	4 punto 2	AJ	Amarilla	Rizoide	1.0 mm	X						X				X	NO	Dura y Seca	
39	5 punto 1	AK	Beige	Fusiforme	4.0 mm				X		Espiculada					X	NO	Humeda	
40	5 punto 1	AL	Crema	Redonda	1.0 mm	X				X				Cupula			NO	Humeda	
41	5 punto 1	AM	Blanca	Redonda	2.0 mm				X	X						X	NO	Humeda	
42	5 punto 2	AN	Amarilla	Rizoide	1.0 mm	X						X		Acuminada		Amarilla	Dura y Seca		

Anexo No. 2. CARACTERISTICAS BACTERIANAS CON TINCION DE GRAM

AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y LECTURA DE GRAM

CEPA AISLADA	Código de la Bacteria	AGAR NUTRITIVO	LECTURA DE GRAM NEGATIVAS (-)	LECTURA DE GRAM	SIEMBRA EN BATERIA	CATALASA, OXIDASA
1	A	SI		COCOS Y RACIMOS	NO	SI
2	B	SI		HILERA Y RACIMOS	NO	SI
3	C	SI		HILERA Y RACIMOS	NO	SI
4	D	SI	BACILOS CORTOS GRAM (-)		SI	NO
5	E	SI	BACILOS GRAM (-)		SI	NO
6	F	SI	BACILOS GRAM (-)		SI	NO
7	G	SI		COCOS Y TETRADAS	NO	SI
8	H	SI				
9	I	NO CRECIO				
10	J	SI		RACIMOS	NO	SI
11	K	SI		RACIMOS	NO	SI
12	L	SI	BACILOS GRAM (-)	RACIMOS	SI	SI
13	M	SI	BACILOS GRAM (-)		SI	NO
14	N	SI	BACILOS ESPORULADOS GRAM (-)		SI	NO
15	Ñ	NO CRECIO				
16	O	SI		COCOS Y TETRADAS	NO	SI
17	P	SI		DIPLOCOCOS Y CADENAS	NO	SI
18	Q	SI		COCOS Y RACIMOS	NO	SI
19	R	SI	BACILOS GRAM (-)	LEVADURA	SI	SI
20	S	SI	BACILOS GRAM (-)	Y RACIMOS	SI	SI
21	T	SI		COCOS Y TETRADAS	NO	SI
22	U	SI	TEÑIR DE NUEVO	No crecio		
23	V	SI	BACILOS CORTOS GRAM (-)		SI	NO
24	W	SI		BACILOS GRAM (+)	NO	SI
25	X	SI	BACILOS ESPORULADOS GRAM (-)		SI	NO
26	Y	SI		DIPLO , TETRADAS Y CADENAS	NO	SI
27	Z	SI		COCOS Y RACIMOS	NO	SI
28	ZZ	SI	BACILOS GRAM (-)	BACILO GRAM VARIABLE	SI	NO
29	Aa	SI	BACILOS CORTOS GRAM (-)		SI	NO
30	AB	SI	BACILOS CORTOS GRAM (-)		SI	NO
31	AC	SI		COCOS Y RACIMOS	NO	SI
32	AD	SI		DIPLOCOCOS Y TETRADAS	NO	SI
33	AE	SI		COCOS Y RACIMOS	NO	SI
34	AF	SI	BACILOS CORTOS GRAM (-)		SI	NO
35	AG	SI		COCOS Y RACIMOS	NO	SI
36	AH	SI		COCOS Y RACIMOS	NO	SI
37	AI	SI		TETRADAS Y RACIMOS	NO	SI
38	AJ	SI		BACILO GRAM VARIABLE	NO	SI
39	AK	SI		BACILO GRAM VARIABLE	NO	SI
40	AL	SI		DIPLOCOCOS Y TETRADAS	NO	SI
41	AM	SI		COCOS Y RACIMOS	NO	SI
42	AN	SI		BACILO GRAM VARIABLE	NO	SI

Anexo No. 3. PRUEBAS BIOQUIMICAS Y OXIDASA. BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

# CORREL ATIVO	ÁREA DE AISLAMIENTO	Código de la Bacteria	TSI			LIA			MIO			CIT	UREA	OXID ASA	GÉNERO BACTERIANO
			S/F	Gas	H ₂ S	S/F	Gas	H ₂ S	Movilidad	Indol	Ornitina				
1	1 punto 1	D	K/k	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	No se pudo identificar por baja concentración de ADN
2	1 punto 1	E	K/k	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	No se pudo identificar según los resultados obtenidos en la bacteria
3	1 punto 1	F	K/k	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	Acinetobacter genomoespecie
4	1 punto 2	L	K/k	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	No se pudo identificar según los resultados obtenidos en la bacteria
5	1 punto 2	M	A/A	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	No se pudo identificar según los resultados obtenidos en la bacteria
6	1 punto 2	N	K/k	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(±)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	No se pudo identificar según los resultados obtenidos en la bacteria
7	2 punto 1	R	A/K	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	Serratia liquefaciens
8	2 punto 2	S	K/k	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	No se pudo identificar pot baja concentración de ADN
9	2 punto 2	V	K/k	(±)	(-)	K/k	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(±)	(-)	Pseudomona sp.
10	3 punto 1	X	K/A	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(±)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	No se pudo identificar pot baja concentración de ADN
11	3 punto 2	ZZ	K/k	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	No se pudo identificar pot baja concentración de ADN
12	3 punto 2	Aa	K/A	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	No se pudo identificar pot baja concentración de ADN
13	3 punto 2	AB	K/k	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	No se pudo identificar pot baja concentración de ADN
14	4 punto 1	AF	K/k	(±)	(-)	K/k	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(±)	(+)	Pseudomona oryzihabitans
15	5 punto 1	AN	K/k	(±)	(-)	K/k	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Pseudomonas stutzeri
15	Control	<i>Escherichia coli</i>	A/A	(+)	(-)	K/k	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	Escherichia coli
16	Control	<i>Salmonella typhi</i>	K/A	(-)	(+)	K/k	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Salmonella tiphymurium
17	Control	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	K/k	(-)	(-)	K/k	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	Pseudomona aeruginosa

Anexo No. 4. LECTURA DE REACCIONES BIOQUIMICAS PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS

# CORRELATIVO	Código de la Bacteria	Catalasa	Coagulasa
1	A	Positiva	Negativa
2	B	Positiva	Negativa
3	C	Positiva	Negativa
4	G	Positiva	Positiva
5	J	Positiva	Negativa
6	K	Positiva	Positiva
7	L	Positiva	Negativa
8	O	Positiva	Negativa
9	P	Positiva	Negativa
10	Q	Positiva	Negativa
11	R	Positiva	Positiva
12	S	Positiva	Negativa
13	T	Positiva	Negativa
14	W	Positiva	Negativa
15	Y	Positiva	Negativa
16	Z	Positiva	Negativa
17	AC	Positiva	Negativa
18	AD	Positiva	Negativa
19	AE	Positiva	Negativa
20	AG	Positiva	Negativa
21	AH	Positiva	Negativa
22	AI	Positiva	Negativa
23	AJ	Positiva	Negativa
24	AK	Positiva	Negativa
25	AL	Positiva	Negativa
26	AM	Positiva	Negativa
27	AN	Positiva	Positiva

Anexo No.5 RESULTADO DE SECUENCION GENETICA.

Anexo No.6 RESULTADO DE SECUENCION GENETICA.

Anexo No.7 TABLA PARA LECTURA DE PRUEBAS BIOQUIMICAS.

Enterobacterias	TSI	LIA	MIO			Citrato	Urea	Indol	MR	VP	Lactosa
	S/F, g, H ₂ S	S/F, g, H ₂ S	M	I	O						
<i>Escherichia coli</i>	A-K/A, ±, -	K/K-A, ±, -	±	+	±	-	-	-	+	-	+ ^b
<i>Shigella dysenteriae</i>	K/A, -, -	K/A, -, -	-	±	-	-	-	-	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	K/A, ±, -	K/A, -, -	-	±	-	-	-	-	+	-	-
<i>Shigella boydii</i>	K/A, -, -	K/A, -, -	-	±	-	-	-	-	+	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	K/A, -, -	K/A, -, -	-	-	+	-	-	-	+	-	- ^a
<i>Salmonella typhi</i>	K/A, -, ± rd	K/K, -, ± rd	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	K/A, +, +	K/K-N, -, ±	±	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>Salmonella cholerae - suis</i>	K/A, +, ±	K/K, -, ±	+	-	+	- ^d	-	-	+	-	-
<i>Arizona hinshawii</i>	K/A, +, +	K/K-N, -, ±	+	-	+	+	-	+	+	-	- ^d
<i>Citrobacter freundii</i>	A-K/A, +, ±	K/A, ±, ±	+	-	-	+	± ^d	-	+	-	+ ⁻
<i>Citrobacter diversus</i>	A-K/A, +, -	K/A, ±, -	+	+	+	+	±	±	+	-	+ ⁻
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	A-K/A, +, -	K/A, +, -	+	+	+	+	+ ⁻	-	+	-	+ ⁻
<i>Proteus vulgaris</i>	A-K/A, ± rd	R/A, -, -	+	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	K/A, ± rd , +	R/A, -, -	+	-	+	+ ^d	±	-	+	-	-
<i>Morganella morganii</i>	K/A, ±, -	K-R/A, -, -	±	+	+	-	+ rd	-	+	-	-
<i>Providencia rettgerii</i>	K/A, ±, -	R/A, -, -	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>Providencia alcalifaciens</i>	K/A, ±, -	R/A, -, -	+	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	K/A, -, -	R/A, -, -	±	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/A, +, -	K/N, ±, -	-	-	-	±	+	+	-	+	+
<i>Klebsiella ozaenae</i>	A/A, +, -	K/K-N, ±, -	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Klebsiella rhinosoleroensis</i>	A/A, +, -	K/A, -, -	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	A/A, +, -	K/K-N, +, -	-	+	-	±	+ ⁻	nr	nr	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A/A, +, -	K/K-N, ±, -	+	-	+	+	-	±	-	+	±
<i>Enterobacter cloacae</i>	A-K/A, +, -	K/A, -, - +	+	-	+	+	+ ^{ri}	+ ⁻	-	+	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	A-K/±, -	K/A, ±, -	±	-	-	+ ⁻	+ rd	+ ⁻	+ ⁻	±	+ ⁻
<i>Enterobacter sakazakii</i>	A/A, +, -	K/A, +, -	+	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>Enterobacter gergoviae</i>	A/A, +, -	K/K-A, +, -	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Hafnia alvei</i>	A-K/A, ±, -	K/K-N, ±, -	+	-	+	-	-	+ ⁻	±	+	-

<i>Serratia marcescens</i>	A-K/A, ±, -	K/K-N, -, -	+	-	+	+	± rd	-	+-	+	-	+
<i>Serratia liquefaciens</i>	A-K/A, ±, -	K/K-N, -, -	+	-	+	+	± rd	-	±	-	-	+
<i>Serratia rubideae</i>	A/A, ±, -	K/K-N, -, -	±	-	-	+	± rd	±	+-	+	+	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	K/A, +, +	K/K-N, +, +	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	A/A, -, -	K-A/A, -, -	+-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	K/A, -, -	K/A, -, -	+-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Yersinia pestis</i>	K/A, -, -	K/A, -, -	--	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Símbolos y abreviaturas empleadas

- A: ácido (TSI y LIA amarillo)
- K: alcalino (TSI: rojo, LIA: morado)
- N: Neutro
- M: Movilidad
- I: Indol
- O: Descarboxilación de ornitina
- : 90% o más da resultados negativos
- +: 90% o más da resultados positivos
- +: Resultados variables, mayoría negativos
- ±: Resultados variables, mayoría positivos
- +-: Resultados variables
- Rd: Reacción débil.
- Nr: Resultados no válidos.
- RI: Reacción lenta.

XIX. INDICE

	Página	
I	SUMARIO.....	1 - 2
II	INTRODUCCION.....	3
III	JUSTIFICACION.....	4
IV	OBJETIVOS.....	5
V	HIPOTESIS.....	6
VI	HIPOTESIS NULA.....	7
VII	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	8
VIII	REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
	1. Aerobiología.....	9
	2. Estudio microbiológico del ambiente.....	9
	3. Importancia de estudios ambientales.....	11
	4. Origen de los contaminantes del aire.....	11
	5. Desarrollo histórico de la microbiología del aire.....	12
	6. Origen de los microorganismos.....	12
	7. Número y distribución de microorganismos.....	13
	8. Supervivencia de los Microorganismos.....	14
	9. Factores que contribuyen a la contaminación ambiental.....	14 - 16
	10. Composición del aire.....	16
	11. Grupo de Riesgo relacionados con la exposición a agentes biológicos.....	17
	12. Diseminación de los microorganismos y enfermedad.....	18
	13. Tipos de Microorganismos.....	18 -25
	14. Aeroscopios y sus Inicios.....	25 -26
	15. Métodos de Muestreo.....	26 -27
	16. Cuando Realizar el Monitoreo de Aire.....	27 -28
	17. El plan del programa de Monitoreo debe considerar.....	28
	18. Requisitos que deben incluir en el Programa.....	28
	19. Normativa.....	29
	20. Clasificación de los ambientes según la contaminación.....	29
	21. Cálculo de resultados.....	29 -30
	22. Periodicidad de los Monitoreos de aire.....	30
	23. Equipo muestreador microbiológico de aire Eco MAS.....	30 -31
	24. Secuenciador genético de ADN 3,130.....	31 -32
	25. Secuenciación de Cepas.....	33
	26. Medios de cultivo.....	33
	27. Identificación de Bacterias.....	34
	28. Material de Referencia.....	35
IX	MATERIALES Y METODOS.....	36
	A. Equipo utilizado.....	36
	B. Reactivos.....	37
	C. Consumibles.....	37
	D. Métodos.....	38

X	FLUJOGRAMA DE BACTERIAS.....	39
XI	FLUJOGRAMA DE HONGOS.....	40
XII	PARTE EXPERIMENTAL.....	41 - 46
XIII	RESULTADOS.....	47 - 50
XIV	DISCUSION DE RESULTADOS.....	51 - 52
XV	CONCLUSIONES.....	53
XVI	RECOMENDACIONES.....	54
XVII	BIBLIOGRAFIA.....	55 - 57
XVII	APENDICE.....	58 - 63
XVIII	ANEXOS.....	64-73
XIX	INDICE.....	74-76

XX. INDICE DE TABLAS

LISTA DE TABLAS		Página
TABLA		
1	Enfermedades Víricas Transmitidas por el Aire.....	19
2	Enfermedades Bacterianas Transmitidas por el Aire.....	22
3	Equipo utilizado.....	36
4	Reactivos.....	37
5	Consumibles.....	37
6	Termociclado.....	45
7	Segundo Termociclado.....	46
8	Resultados de UFC/m ³ de Bacterias	47
9	Resultados de UFC/M3 de Hongos	48
10	Resultados de Bacterias obtenidos en el Secuenciador Genético.	49
11	Resultados de Hongos obtenidos en el Secuenciador Genético.	49
12	Factor Peso Ponderal.....	50

