

00376 10  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION DE AEROBACTERIAS  
ENTERICAS EN AMBIENTES INTRA Y  
EXTRAMUROS DE LA CIUDAD DE MEXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(ECOLOGIA Y CIENCIAS AMBIENTALES)

P R E S E N T A :  
MARIA EVA SALINAS CORTES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRMA AURORA ROSAS PEREZ.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

25888



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



*Para Andrea,  
mi niña linda,  
mi collar de piedras finas,  
mi plumaje de Quetzal...*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi mayor agradecimiento a los miembros del jurado:

Dra. Irma Aurora Rosas Pérez  
Dra. Ana Flisser Steinbruch  
Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro  
Dr. Teófilo Herrera Suárez  
Dr. Edmundo Calva Mercado  
M. en C. Teodoro Gutiérrez Castrejón  
M. en C. Carlos Alberto Eslava Campos

por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis, así como por sus correcciones y sugerencias, las cuales sin duda contribuyeron a mejorar la calidad de este trabajo. En especial, agradezco a la Dra. Irma Rosas por la dirección de esta tesis ; a la Dra. Ana Flisser y al M. en C. Teodoro Gutiérrez, por ser miembros de mi Comité Tutorial.

Al Instituto Mexicano del Petróleo, Consejo Británico, Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), por el financiamiento parcial otorgado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Fernando García, Director del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, por su apoyo en el uso de la infraestructura de esta institución, durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Alejandro Cravioto, Director de la Facultad de Medicina ; al M. en C. Carlos Eslava, Coordinador del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM ; y al Biol. Armando Navarro, por el análisis serológico de las cepas de *Escherichia coli*.

A la M. en C. Alma Luz Yela Miranda, por su colaboración en el análisis bacteriológico de las muestras.

Al Ing. Raúl Belmont, por su ayuda en el trabajo de computación y en el análisis estadístico de los datos.

A los Ingenieros Manuel García y Alfredo Rodríguez, por su colaboración en el mantenimiento del equipo de muestreo y de laboratorio.

Al M. en C. Miguel Meneses, por el material fotográfico presentado en esta tesis.

A la Dra. Rocío Chapela, por su ayuda en la selección de las viviendas ;  
asimismo, agradezco sinceramente a todas las personas que permitieron la  
toma de muestras microbiológicas de sus casas.

A Reyna Focil, Patricia Romano, Leticia Martínez, Elsa González, Erika  
Marban y Felipe Cruz, por su apoyo en la realización de los muestreos.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo, que de una u otra manera  
contribuyeron en la realización de esta investigación : M. en I. Armando Báez,  
Ma. Carmen Torres, Rocío García, Hugo Padilla, Irene Silva, Calixto Cuevas,  
Marcos Carrillo, Sra. Amalia, Tere y Don Panchito.

Finalmente, pero no por ser menos importante, agradezco a mi querido Lobo  
todo el apoyo y cariño que me ha brindado, alentando mi superación académica.

# CONTENIDO

|                                                           | Página |
|-----------------------------------------------------------|--------|
| Resumen .....                                             | 1      |
| 1. Introducción .....                                     | 3      |
| 2. Antecedentes .....                                     | 6      |
| 2.1 Aerobiología .....                                    | 6      |
| 2.2 Comportamiento de las bacterias en la atmósfera ..... | 6      |
| 2.3 Osmorregulación de las bacterias Gram-negativas ..... | 15     |
| 3. Objetivos .....                                        | 18     |
| 4. Área de estudio .....                                  | 19     |
| 5. Material y Método .....                                | 24     |
| 5.1 Muestreo de extramuros .....                          | 24     |
| 5.2 Muestreo de intramuros .....                          | 26     |
| 5.3 Análisis estadístico .....                            | 29     |
| 6. Resultados .....                                       | 30     |
| 6.1 Ambiente extramuros .....                             | 30     |
| 6.2 Ambiente intramuros .....                             | 42     |
| 7. Discusión .....                                        | 51     |
| 7.1 Ambiente extramuros .....                             | 51     |
| 7.2 Ambiente intramuros .....                             | 56     |
| 8. Conclusiones .....                                     | 61     |
| 9. Referencias .....                                      | 64     |
| Anexos .....                                              | 73     |

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la presencia de bacterias coliformes suspendidas en la atmósfera y depositadas en el polvo, en diversos ambientes intra y extramuros de la Ciudad de México, así como probar el uso de la glicinbetaína en la recuperación de las bacterias provenientes de la atmósfera.

En la primera parte de este estudio, se realizó la caracterización bacteriológica de la atmósfera en tres áreas de la ciudad con diferente índice de urbanización. Las concentraciones más altas de aerobacterias cultivables se obtuvieron durante la época de secas, con vientos dominantes del este, presentándose valores de  $4\text{-}5 \times 10^3$  UFC/m<sup>3</sup> de aire. El norte y centro de la ciudad registraron los niveles máximos de bacterias coliformes (70 UFC/m<sup>3</sup>). Durante el período de lluvias el número de aerobacterias disminuyó, debido al fenómeno de "lavado atmosférico". La mayor proporción de aerobacterias (50-70%) se asoció a partículas con un diámetro aerodinámico  $>5\mu\text{m}$ . Se obtuvo una correlación significativa ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones de aerobacterias y los niveles de partículas suspendidas en la atmósfera. El porcentaje más alto de bacterias Gram-negativas estuvo representado por bacilos no fermentadores; entre las bacterias coliformes *Enterobacter* fue el género más abundante, lográndose aislar también *Escherichia coli* en bajas concentraciones, sobre todo en el norte y centro del Distrito Federal.

En la segunda parte del estudio, se tomaron muestras de las partículas suspendidas y depositadas en el interior y el exterior de 30 casas localizadas al sur de la Ciudad de México. En el aire, las concentraciones de bacterias mesófilas cultivables fluctuaron entre  $10^2$  a  $10^3$  UFC/m<sup>3</sup> y en el polvo entre  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g. En un elevado porcentaje de las muestras, los niveles de bacterias fueron más altos en el interior que en el exterior de las viviendas, con una relación intramuros/extramuros  $>1\%$ , en el 70 a 80% de las muestras de aire, y del 50 al 70% en las de polvo. Estos resultados sugieren la existencia de diferentes fuentes diseminadoras de bacterias, en el interior de las casas, que deben identificarse para lograr su control.

No se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de aerobacterias obtenidas en los medios con y sin glicinbetaína; sin embargo, en el caso de las cepas de *E. coli* el aislamiento sólo se pudo realizar en el medio de cultivo conteniendo este osmoprotector. Lo anterior sugiere que las bacterias entéricas se estresan durante el proceso de aerosolización. La mayor concentración de bacterias suspendidas en la atmósfera se asoció a partículas con un diámetro aerodinámico  $>5\mu\text{m}$ , que corresponde a la fracción no respirable. *Enterobacter* fue el género que se identificó con mayor frecuencia, tanto del aire como del polvo; *E. coli* fue más

abundante en el interior, que en el exterior de las casas, representando el 4.3% y el 5.5% del total de bacterias entéricas aisladas del aire y del polvo, respectivamente. Se identificaron 70 serotipos diferentes de *E. coli*, siendo los más comunes O39:H11, O58:H30, O70:H11, O86:H10, y O91:H10. Dentro de los serotipos de cepas enteropatógenas se encontraron O20:H-, O28:H-, O86:H34, O127:H9 y O142:H34, provenientes del polvo depositado en intramuros. El 14 % del total de las cepas de *E. coli* presentaron resistencia a más de 2 antibióticos, siendo los más comunes ampicilina, ticarcilina y tetraciclina. Estos resultados sugieren que el amplio consumo de este tipo de antibióticos para el control empírico de enfermedades diarreicas favorece la selección de mutantes resistentes, lo cual representa un riesgo por lo observado en el estudio referente a la diseminación aérea de estos microorganismos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Ciudad de México, con una población aproximada de 18 millones de habitantes, ocupa actualmente el tercer lugar en la lista de las ciudades más densamente pobladas del mundo (Ezcurra y Mazari-Hiriart, 1996). Como consecuencia, esta ciudad enfrenta una serie de problemas importantes como son: el decremento en la calidad del aire y del agua; abastecimiento de agua, comida y energía; recolección y disposición de desechos sólidos; tratamiento de aguas residuales; y problemas de salud relacionados con contaminantes ambientales, entre otros. A diferencia de los países industrializados, que cuentan con una economía sólida, para los países menos desarrollados la solución a estos problemas es cada vez más difícil, ya que la demanda de servicios generalmente excede la tasa de crecimiento económico.

En el Distrito Federal, diariamente se generan alrededor de 14,000 toneladas de basura, constituida en gran parte por materia orgánica con un alto grado de humedad, lo que favorece el desarrollo de diversos microorganismos. Además, la inclusión de pañales desechables y heces de animales contamina la basura doméstica, con el subsecuente riesgo de liberar al ambiente microorganismos potencialmente patógenos (Peterson, 1974; Crook *et al.*, 1987; Lacey, 1989; Rosas *et al.*, 1996).

Con relación a los desechos líquidos, aproximadamente el 7% del total del agua residual generada en el Distrito Federal es tratada, el resto circula en ríos y canales (algunos a cielo abierto) hacia un reservorio al norte de la ciudad, donde las aguas negras no-tratadas son usadas posteriormente para la irrigación de campos de cultivo (Ezcurra y Mazari-Hiriart, 1996). Diversos estudios han demostrado que tanto las plantas de tratamiento de aguas residuales, como las aguas tratadas empleadas para la irrigación, liberan a la atmósfera grandes cantidades de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias potencialmente patógenas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* (Randall y Ledbetter, 1966; Hickey y Reist, 1975; Fedorak y Westlake, 1980; Willeke y Baron, 1987; Rosas y Yela, 1989). En algunas áreas suburbanas de la ciudad se carece también de sistema de drenaje, por lo que el fecalismo al aire libre llega a ser una práctica común. De esta manera, la materia de origen fecal se convierte en una fuente potencial de contaminación biológica del suelo, el agua y consecuentemente del aire.

Las heces contienen tanto bacterias de la familia Enterobacteriaceae como: *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, así como microorganismos anaerobios, miembros de los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium* y *Fusibacterium*, así como otras bacterias patógenas como es el caso de *Campylobacter*, *Salmonella* y *Shigella*, provenientes de enfermos y portadores sanos.

La concentración normal de bacterias contenidas en el material fecal es de aproximadamente  $10^{11}$  bacterias por gramo, de las cuales alrededor de  $10^8$  están representadas por *E. coli* (Rosas *et al.*, 1994 b).

En México, las bacterias enteropatógenas aisladas con mayor frecuencia de las heces de niños con diarrea son *Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli* (Cravioto *et al.*, 1990; Bustamante *et al.*, 1995). Algunas cepas de estas bacterias presentan resistencia a antibióticos comúnmente usados en casos de diarreas, lo que dificulta su tratamiento (Haberberger *et al.*, 1991; Torres *et al.*, 1995).

En general *Escherichia coli*, forma parte de la microbiota autóctona del intestino del hombre, siendo inocua en este su hábitat primario; sin embargo, al salir de su microambiente y alcanzar otros tejidos, puede producir diversos procesos patológicos. Fue hasta principios de 1950 en que se confirmó la participación de *E. coli* como un patógeno intestinal. Con base en sus mecanismos de patogenicidad intestinal, actualmente *E. coli* se clasifica en los siguientes grupos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), y *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) (Valentini *et al.*, 1992).

La presencia de bacterias coliformes y en especial de *E. coli*, en hábitats secundarios, se considera como un indicador de contaminación fecal reciente en el ambiente y por lo tanto de riesgo hacia la salud pública (American Public Health Association, 1985). Esta aseveración se basa en el hecho de que las bacterias coliformes fecales no pueden sobrevivir ni reproducirse fuera de su hábitat primario por períodos extensos de tiempo. Sin embargo, actualmente la permanencia de estas bacterias en el ambiente es un tema que está en discusión, ya que se han encontrado cepas de *E. coli* aparentemente de vida libre (Rivera *et al.*, 1988).

Originalmente se pensaba que las bacterias (sobre todo las Gram-negativas) eran incapaces de tolerar ambientes extremos, como el agua de mar y la atmósfera, donde el estrés osmótico, la radiación solar y la temperatura entre otros factores, provocarían su muerte, principalmente por la pérdida del agua celular. En la actualidad, estas ideas están siendo modificadas, ya que existen evidencias de la capacidad osmorreguladora de algunas bacterias, entre las que se encuentra *E. coli* (Csonka, 1989; Marthi *et al.*, 1990). Por lo tanto, la incorporación de algunos compuestos osmoprotectores a los medios de cultivo y de colecta, incrementa la capacidad de las bacterias para formar colonias, mejorando considerablemente la eficiencia en el aislamiento de las bacterias Gram-negativas presentes en la atmósfera (Crook *et al.*, 1988; Marthi y Lighthart, 1990).

No obstante la importancia ecológica y epidemiológica que tiene la presencia de bacterias en la atmósfera, son pocos los estudios aerobiológicos dirigidos a caracterizar en cantidad y calidad los niveles de aerobacterias en zonas urbanas y suburbanas. La mayoría describe las poblaciones de aerosoles microbianos en áreas cercanas a fuentes puntuales de contaminación, especialmente las plantas de tratamiento de aguas residuales (Hickey y Reist, 1975), dando poca importancia a los niveles de fondo.

Por otro lado, el suelo ha sido poco considerado en los estudios ambientales, a pesar de ser una fuente importante de contaminación tanto de ambientes intramuros como extramuros, ya que en éste se depositan y acumulan continuamente residuos tanto químicos como biológicos que pueden ser aerosolizados fácilmente. Por lo tanto, la calidad biológica de la atmósfera depende en gran medida de las condiciones del suelo.

Con base en lo antes referido, en el presente trabajo se propone determinar la presencia de bacterias coliformes en ambientes extramuros e intramuros (domésticos) de la Ciudad de México para evaluar su posible participación en la transmisión de microorganismos patógenos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 AEROBIOLOGÍA

El estudio de los microorganismos presentes en el aire se remonta a los experimentos de Spallanzani en 1776 y a los trabajos de Pasteur y Tyndall, entre otros, quienes usaron métodos aerobiológicos a la mitad del siglo XIX para combatir la teoría de la generación espontánea. En este siglo, los trabajos de Pasteur y Koch demostraron que las bacterias pueden sobrevivir en el aire y se reconoció que la atmósfera es la ruta de transmisión de muchas enfermedades. Sin embargo, la aerobiología no se estructuró como una disciplina hasta 1930 (Gregory, 1973; Edmonds, 1979).

La aerobiología es una disciplina enfocada al estudio de las partículas biológicas presentes en la atmósfera intra y extramuros, e incluye:

1. La fuente y dispersión de los microorganismos, es decir el lugar donde crecen y se reproducen, y a partir del cual son diseminados, así como los tipos de dispersión de los mismos.
2. El estudio de la naturaleza física y biológica de los bioaerosoles, así como sus mecanismos y patrones de transporte a través de la atmósfera.
3. Los procesos de depositación de las partículas biológicas sobre las superficies naturales: suelo, plantas, animales, y dentro del tracto respiratorio humano, así como los posibles efectos adversos a la salud que pueden producir (Burge, 1995).

Entre las partículas biológicas de importancia aerobiológica se encuentran virus, bacterias, fragmentos y esporas de hongos, algas, protozoarios, esporas de helechos, polen, fragmentos de plantas, semillas, ácaros e insectos. La aerobiología incluye también, dentro de su estudio, los gases y material particulado (no biológico) que puede afectar la viabilidad de los microorganismos en la atmósfera, como el humo, el polvo, núcleos radioactivos y pesticidas, entre otros. La mayoría de los bioaerosoles presentan un diámetro comprendido entre 0.5 a 100  $\mu\text{m}$  y se pueden aislar como organismos independientes (propágulos o células vegetativas), en forma de aglomerados, o asociados a partículas de tamaño diverso (Edmonds, 1979; Lighthart y Mohr, 1994).

### 2.2 COMPORTAMIENTO DE LAS BACTERIAS EN LA ATMÓSFERA

Con base en la distribución vertical de su estructura térmica, la atmósfera se divide en cuatro capas: tropósfera, estratósfera, mesósfera y termósfera, en orden ascendente

en altura. En el límite de estas capas se encuentran la tropopausa, la estratopausa y la mesopausa, en las cuales la temperatura prácticamente no varía con la altitud (Cox, 1987; Lighthart y Mohr, 1994). La tropósfera es la capa de interés para la aerobiología, ya que en ésta se realizan todos los eventos que favorecen la generación y el transporte de los microorganismos, como son los movimientos convectivos, advectivos y de turbulencia. Esta capa se encuentra en la región más baja de la atmósfera, su altura va desde el nivel del suelo hasta 10 km de altitud en promedio y se caracteriza por un decremento en la temperatura, a medida que se incrementa la altura. La tropósfera contiene aproximadamente el 80% de la masa atmosférica total y virtualmente toda el agua de la atmósfera. La parte más baja de esta región se llama la capa límite atmosférica, donde tiene lugar el intercambio directo de calor, humedad y otros contaminantes, entre la masa gaseosa y la superficie terrestre. (Cox, 1987; Lighthart y Mohr, 1994).

La dispersión de las bacterias se realiza usualmente en la tropósfera, aunque se han aislado tanto a *Mycobacterium* como a *Micrococcus* en la mesósfera, a una altura aproximada de 48-77 km. Es probable que la presencia de pigmentación en *Micrococcus* le proporcione resistencia contra la luz ultravioleta, en esta capa atmosférica (Imshenetsky *et al.*, 1978). La concentración de aerobacterias o de partículas que contienen bacterias, normalmente varía inversamente a la altitud, debido a que las fuentes de aerobacterias se encuentran sobre la superficie terrestre (Fulton, 1966; Wright *et al.*, 1969). Además, la turbulencia del aire tiende a distribuir verticalmente un gran número de partículas, y por lo tanto disminuye su concentración. La reducción más grande en la concentración vertical de aeropartículas se presenta en los primeros 50 m de altura (Wright *et al.*, 1969). Sin embargo, la excepción a este comportamiento se presenta durante las inversiones térmicas, donde se pueden aislar concentraciones mayores por arriba de la capa de inversión térmica que por debajo de la misma (Lighthart y Mohr, 1994).

## Generación de bacterias a la atmósfera

La atmósfera es un medio continuo de transporte de bioaerosoles, entre los ambientes intra y extramuros; no obstante existen barreras que impiden el libre flujo de aire entre ambos ambientes, lo que les imprime a cada uno ciertas características particulares. Por esta razón es conveniente estudiar estos dos ambientes por separado.

### 1. Ambiente extramuros

Las bacterias constituyen uno de los grupos más abundantes en el ambiente extramuros, es común encontrar concentraciones de  $10^9$  UFC/g de suelo. En

condiciones naturales se les encuentra en el agua, el suelo y las plantas, principalmente como organismos saprobios en sustrato vegetal y animal (Campbell, 1987; Burge, 1995).

Debido a que las bacterias carecen de mecanismos activos de liberación, son introducidas a la atmósfera por procesos mecánicos, como son la acción del viento y la lluvia sobre el suelo (principalmente en áreas extensas de suelo expuesto); los cuerpos de agua y la superficie de las hojas; el movimiento de los animales; y actividades humanas, como la manipulación de composta y las prácticas agrícolas, entre otras. La dispersión de los microorganismos depende en gran parte de la humedad del ambiente. Bajo condiciones secas, una ligera turbulencia favorece la diseminación de las bacterias de diversas superficies y su incremento las transporta a grandes alturas por transporte convectivo. Cuando las superficies se encuentran húmedas la dispersión de los microorganismos disminuye (Fulton, 1966).

La superficie terrestre contribuye más que las fuentes acuáticas a incrementar los niveles de bacterias en el aire. Las aerobacterias aumentan en concentración durante la época de secas, debido al transporte convectivo de las partículas provenientes de las superficies secas y calientes. Durante la época de lluvias, el número de aerosoles bacterianos disminuye significativamente, debido al "lavado" de la atmósfera; sin embargo, las gotas de lluvia también pueden contribuir a liberar microorganismos a la atmósfera por su impacto sobre las superficies (Fulton, 1966; Bovallius *et al.*, 1978; Edmonds, 1979). También existen cambios diurnos en la concentración de aerobacterias. Durante el día, los procesos convectivos pueden liberar a la atmósfera partículas de suelo conteniendo bacterias, mientras que por la noche el número de bacterias en la columna de aire decrece, no sólo por la muerte de los microorganismos, sino por la acción de la sedimentación. La interacción de la sedimentación nocturna con la alta humedad del ambiente y la ausencia de radiación solar, puede producir un incremento en las bacterias viables a nivel del suelo (Edmonds, 1979).

Las fuentes acuáticas liberan un menor número de aerosoles bacterianos a la atmósfera y éstos son generados por el movimiento del aire sobre los cuerpos de agua, por la formación de olas, por el golpe de la lluvia, el granizo y la nieve, sobre la superficie del agua, así como por la formación de burbujas de aire, las cuales explotan al llegar a la superficie, liberando un alto número de microorganismos (Edmonds, 1979; Willeke y Baron, 1987).

Las plantas son el hábitat natural de muchos microorganismos epífitos (fitopatógenos y saprobios) que incluyen virus, bacterias y hongos (Preece y Dickinson, 1971; Bernstein *et al.*, 1973). Un gran número de bacterias se pueden remover de la superficie de las plantas por medio de la turbulencia convectiva o frontal (Fulton, 1966), así como por la acción de las gotas de lluvia (Butterworth y McCartney, 1991).

Durante la época húmeda del año, la vegetación puede contribuir en mayor proporción que el suelo a incrementar la carga bacteriana del aire (Lindemann *et al.*, 1982; Lindemann y Upper, 1985).

Una fuente importante, de bacterias patógenas la constituyen los animales y el hombre. Al hablar, toser y estornudar, se liberan materiales adheridos al tracto respiratorio asociados con microorganismos. El tamaño de las partículas exhaladas depende de la velocidad del aire, de la viscosidad del fluido y de la vía de salida (nariz o boca). De estos procesos, el estornudo es el más vigoroso y libera al ambiente más de un millón de aerosoles de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro (Edmonds, 1979; Burge, 1995 ). Por otra parte, la descamación de la piel y el cabello es una fuente constante de generación de virus, bacterias y hongos (Clark y Shirley, 1973), que pueden tener importancia epidemiológica. La saliva, las heridas y las heces de los animales y de los seres humanos (sobre todo si se encuentran enfermos) pueden contaminar el suelo con microorganismos potencialmente patógenos, existiendo la posibilidad de que sean suspendidos posteriormente a la atmósfera.

Finalmente, las fuentes antropógenas contribuyen de manera significativa a incrementar la carga bacteriana en la atmósfera. La actividad vehicular puede generar un gran número de partículas de polvo cargadas con microorganismos (Lighthart y Mohr, 1994). Otras fuentes fijas de contaminación biológica incluyen las plantas de tratamiento de aguas residuales (Randall y Ledbetter, 1966; Fannin *et al.*, 1976), los centros de manejo de desechos sólidos (Crook, *et al.*, 1987; Lacey, 1989; Rosas *et al.*, 1996), las torres de enfriamiento de plantas generadoras de energía (Adams *et al.*, 1980), y fuentes industriales relacionadas con productos orgánicos, como la industria papelera (Niemela *et al.*, 1985; Rosas *et al.*, 1988), fábricas de hilados de algodón (Lacey y Lacey, 1987) y la industria azucarera (Forster *et al.*, 1989), entre otras.

#### *Concentraciones de aerobacterias en extramuros*

Las concentraciones de bacterias totales cultivables obtenidas en extramuros, comúnmente se encuentran en el orden de 100 a 1000 unidades formadoras de colonias (UFC) por  $\text{m}^3$  de aire, pero se han aislado concentraciones de hasta 4000 UFC/ $\text{m}^3$  en una calle transitada y de 2500 UFC/ $\text{m}^3$  en un parque urbano (Bovallius *et al.*, 1978; Jones y Cookson, 1983). Mancinelli y Shulls (1978), con el uso de filtros para impactación, encontraron concentraciones de aerobacterias de 13 UFC/ $\text{m}^3$  a aproximadamente 2000 UFC/ $\text{m}^3$  de aire, en un ambiente urbano.

En general, todos los estudios realizados en este tipo de ambientes (zonas urbano-industriales, densamente pobladas) se caracterizaron por presentar una variación

muy amplia en las concentraciones de microorganismos. Asimismo, se observa una periodicidad estacional con concentraciones más altas durante el verano y el otoño y un número de aerobacterias significativamente menor durante el invierno, debido a que en las zonas templadas el suelo se cubre de nieve (Bovallius *et al.*, 1978; Jones y Cookson, 1983).

Las bacterias aisladas con mayor frecuencia son microorganismos comunes del suelo, así como bacterias pigmentadas y algunas esporuladas (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Aerococcus* y *Bacillus*). Aparentemente, la presencia de carotenos en las bacterias le brinda protección contra la radiación solar (Wright *et al.*, 1969; Mancinelli y Shulls, 1978; Yongyi *et al.*, 1993). Los cocos y bacilos Gram-positivos (esporulados y no-esporulados) predominan sobre las bacterias Gram-negativas (Wright *et al.*, 1969; Yongyi *et al.*, 1993). En ninguno de estos estudios se han identificado bacterias coliformes y sólo se han reportado estreptococos fecales en concentraciones bajas (6 UFC/m<sup>3</sup>), en una zona suburbana cercana a una planta de tratamiento de aguas residuales (Jones y Cookson, 1983).

La correlación entre las concentraciones de aerobacterias y los parámetros meteorológicos no ha sido significativa (Wright *et al.*, 1969; Jones y Cookson, 1983); no obstante, puede mencionarse que la lluvia y la humedad relativa alta causan un decremento en las cuentas bacterianas, mientras que la temperatura y la velocidad del viento incrementan su número (Bovallius *et al.*, 1978). En general, las bacterias colectadas en extramuros se asocian en su mayoría a partículas con un diámetro aerodinámico > 5µm, que corresponden a la fracción no respirable.

En México, Rosas y colaboradores (1994 a) evaluaron la calidad bacteriológica del aire en una zona suburbana de la Ciudad de México. Las concentraciones de aerobacterias totales fluctuaron entre 14 UFC/m<sup>3</sup> a 13 x10<sup>3</sup> UFC/m<sup>3</sup> de aire. En este estudio, se reportó el aislamiento de bacterias coliformes fecales, con un valor máximo de 11 UFC/m<sup>3</sup>, mientras el número de estreptococos fecales fue de 0-10 UFC/m<sup>3</sup>. Las bacterias coliformes aisladas con mayor frecuencia fueron *Escherichia coli*, *Serratia* y *Enterobacter*. La incidencia más alta de aerobacterias se obtuvo durante la época de secas, correlacionando significativamente con las partículas suspendidas, la humedad relativa y la variación de temperatura. La presencia de bacterias coliformes en el aire refleja la contaminación fecal del suelo, con el consecuente riesgo potencial hacia la salud.

## 2). Ambiente Intramuros

En los ambientes intramuros existen una gran variedad de contaminantes atmosféricos, tanto químicos como biológicos. Muchos de los contaminantes presentes

en el aire de intramuros son similares, e incluso provienen de fuentes exteriores. Sin embargo, las concentraciones de intramuros pueden ser superiores a las del exterior, debido a que los contaminantes se acumulan en este ambiente por la inadecuada ventilación o limpieza de las construcciones, así como por la presencia de fuentes productoras de diversos tipos de microorganismos (Muilenberg, 1995). Por esta razón, la transmisión de enfermedades infecciosas en intramuros es generalmente más frecuente que en el exterior (Edmonds, 1979). Además, ya que el sistema respiratorio es la puerta de entrada tanto de microorganismos, como de diversos contaminantes químicos, es muy posible que el efecto que produzcan sea sinérgico (Brooks y Davis, 1992).

Las partículas biológicas encontradas en intramuros incluyen virus, bacterias, algas, protozoarios, hongos, ácaros, insectos y restos de plantas. Los microorganismos se pueden encontrar viables o solamente los componentes estructurales de los mismos, como es el caso de las endotoxinas en las bacterias Gram-negativas, y/o metabolitos volátiles (Lighthart y Mohr, 1994 ; Rosas *et al.*, 1997). Para que los microorganismos se puedan reproducir, requieren de una temperatura y humedad adecuadas, así como de un sustrato físico y nutritivo. Estas condiciones pueden encontrarse fácilmente en el interior de algunas viviendas y de diversos ambientes ocupacionales. Las fibras textiles, la madera, el papel y las plantas, entre otros materiales, pueden ser fácilmente colonizados por bacterias y otros microorganismos, sobre todo en las áreas húmedas como los baños, los sótanos, las cocinas y los refrigeradores (Burge *et al.*, 1985).

Los humidificadores, los sistemas de aire acondicionado y los vaporizadores, están ligados directamente con la contaminación biológica de intramuros. Un gran número de bacterias, hongos, algas y amibas de vida libre, ha sido recuperado de los recipientes con agua de estos aparatos, siendo aerosolizados cuando los sistemas están en funcionamiento (Ager y Tichner, 1983). Además, los filtros empleados en los sistemas de aire acondicionado acumulan el polvo orgánico, propiciando el desarrollo y generación a la atmósfera de diversos microorganismos (Burge *et al.*, 1980).

El estudio de las bacterias Gram-negativas en intramuros ha sido motivo reciente de gran interés, sobre todo en lugares con sistemas de aire acondicionado y humidificación. Su presencia se asocia con enfermedades respiratorias, como la neumonía, así como con diversos cuadros con síntomas respiratorios que involucran reacciones de hipersensibilidad (como alergia, rinitis y asma), tos crónica; síndrome del polvo orgánico tóxico; fiebre de los humidificadores; y alveolitis alérgica extrínseca (Hood, 1990). Todos estos síndromes se relacionan con la presencia de una gran variedad de bacterias, hongos, actinomicetos, protozoarios, micotoxinas y endotoxinas, (Rylander y Burrell, 1988; Hood, 1990; Crook y Olenchock, 1995).

Las bacterias Gram-negativas presentan ciertas características que las hacen causantes potenciales de estas afecciones. En primer lugar, todas poseen endotoxinas, las cuales inducen inflamación e irritación pulmonar (Rylander, 1994). En segundo lugar, las proteínas de superficie (en una variedad de estructuras como son flagelos, pili y pared celular) y la cápsula o glicocálix (compuesta de carbohidratos y/o proteínas) pueden actuar como alérgenos (Chapman y Platts-Mills, 1980). Entre las bacterias Gram-negativas asociadas a estas enfermedades y síndromes, se encuentran *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *E. aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Legionella* y *Brucella* (Hood, 1990).

### *Concentraciones de aerobacterias en intramuros*

Son pocos los estudios aerobiológicos realizados en ambientes intramuros y se han enfocado principalmente a la caracterización de hospitales (Groschel, 1980; Kelsen, 1980), escuelas (Maroni *et al.*, 1993) y oficinas. Con relación a las especies y concentraciones de aerobacterias presentes en ambientes domésticos, existe muy poca información publicada. Reponen y colaboradores (1989) colectaron muestras durante un período de dos años en diversas casas localizadas en tres áreas urbanas de Finlandia. La media geométrica obtenida fue de 330 UFC/m<sup>3</sup>. Godish y colaboradores (1993) reportaron una media geométrica de 585 UFC/m<sup>3</sup> en 40 casas estudiadas en Australia, mientras que Hunter y colaboradores (1993), quienes tomaron muestras de casas en el Reino Unido, reportaron niveles de bacterias de 658 UFC/m<sup>3</sup> en el invierno y de 1107 UFC/m<sup>3</sup> durante el verano. Estos estudios fueron realizados con el equipo de muestreo Andersen. En 1995, Hunter y colaboradores estudiaron 163 casas en el Reino Unido, haciendo uso de filtros de policarbonato; las cuentas de aerobacterias fluctuaron entre cero a  $51 \times 10^3$  UFC/m<sup>3</sup> con una media geométrica de 366 UFC/m<sup>3</sup>.

La composición de las aerobacterias en intramuros está dominada por bacilos y cocos Gram-positivos (Macher *et al.*, 1991; Godish *et al.*, 1993; Maroni *et al.*, 1993). Los bacilos Gram-positivos como *Arthrobacter*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*, fueron las bacterias más abundantes en 40 casas estudiadas en Australia, seguidas de otras bacterias Gram-positivas, como los cocos (*Micrococcus* y *Staphylococcus*), actinobacterias y otras bacterias esporuladas (Godish *et al.*, 1993). En este estudio los bacilos Gram-negativos constituyeron sólo el 5% de las colonias identificadas. Hunter y colaboradores (1995), en el Reino Unido, identificaron como organismos predominantes a *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* spp. Las bacterias Gram-positivas sobrepasaron a las Gram-negativas en una proporción aproximada de 9:1.

En general, se acepta que el número y tipo de microorganismos presentes en un ambiente residencial varíe entre las diferentes habitaciones de la casa, entre las estaciones del año, y ante la presencia de los ocupantes de las viviendas. Macher y colaboradores (1991) obtuvieron un incremento significativo en las concentraciones de aerobacterias, después de que diversos departamentos nuevos fueron habitados. En este estudio las concentraciones más altas de bacterias se registraron en la sala y en la cocina (140 y 144 UFC/m<sup>3</sup>, respectivamente). Se han propuesto 4500 UFC/m<sup>3</sup>, como la concentración normal de aerobacterias para un ambiente doméstico de zonas urbanas y suburbanas en un clima subártico (Reponen et al., 1990). Sin embargo, sería importante considerar la composición de las mismas, ya que un incremento en las bacterias Gram-negativas podría considerarse como un factor de riesgo para los habitantes de las viviendas.

### *El polvo orgánico*

La exposición al polvo orgánico se presenta en ambientes como los agrícolas, industriales, residenciales, escuelas, oficinas, etc. En cada ambiente el polvo orgánico generado proviene de diferentes fuentes y es producido por diversos procesos mecánicos, lo cual afecta la composición del polvo, la concentración y la distribución del tamaños de las partículas. El efecto que puede causar en la población expuesta al polvo orgánico depende de la duración e intensidad de la exposición, así como de la susceptibilidad de cada individuo al inhalar sustancias tóxicas (Jacobs, 1994).

En un ambiente residencial no industrial, el polvo orgánico es una mezcla compleja que contiene, entre otras cosas: fibras, silicatos, partículas producidas por la combustión, artrópodos o parte de los mismos, así como sus excrementos, proteínas de orina, piel y saliva, provenientes de ratones, ratas, gatos, perros y aves. Además, están presentes los microorganismos que se han acumulado del aire del exterior e interior, y aquéllos que crecen en la materia orgánica del polvo (Rylander, 1994; Burge, 1995). La mayoría de las partículas que conforman el polvo orgánico son higroscópicas y pueden absorber agua del aire a niveles relativamente bajos de vapor de agua, favoreciendo la reproducción o permanencia de los microorganismos. De esta manera, la humedad del microambiente que rodea al polvo orgánico está relacionada con la humedad de la atmósfera. El uso de sistemas de aire acondicionado y humidificación incrementa la humedad del ambiente y por lo tanto favorece el desarrollo de microorganismos (Burge, 1995).

Las alfombras acumulan una gran cantidad de polvo orgánico conteniendo microorganismos y, si además éstas son instaladas en áreas húmedas o poco ventiladas, proporcionan el ambiente ideal para el desarrollo de una gran cantidad de bacterias y hongos (Lighthart y Mohr, 1994). Se ha observado que las concentraciones

de *Pseudomonas aeruginosa* en el aire se incrementan considerablemente, después de que las alfombras son lavadas (Finch *et al.*, 1978). Los componentes del polvo orgánico pueden ser aerosolizados fácilmente, afectando la calidad del aire de intramuros. Esto ocurre cuando los pisos y alfombras son barridos o aspirados, cuando se sacuden muebles y cortinas, al caminar, o con cualquier otra actividad mecánica que remueva el polvo sedimentado. A pesar de que las bacterias son un componente común en el polvo de las casas, especialmente aquellas especies comensales de la piel de los humanos, así como diversas especies de *Bacillus*, éstas no han sido bien estudiadas a la fecha.

### Transporte de las aerobacterias

Las partículas biológicas están sujetas a las mismas leyes físicas que las no-biológicas, aunque su permanencia en la atmósfera también depende de las características biológicas de los propios microorganismos. Entre los principales atributos físicos que deben ser estimados en un aerosol se encuentran: el movimiento browniano, el gradiente eléctrico, el campo gravitacional, la fuerza de la inercia, la densidad de la partícula y la humedad e higroscopicidad (Cox, 1987).

Una vez que las aerobacterias han sido aerosolizadas, su transporte depende de las condiciones meteorológicas locales. Una nube de partículas sigue los movimientos del viento y dependiendo de la turbulencia del aire, la nube puede ser dispersada a diferentes alturas. La turbulencia depende de la topografía del suelo, de la temperatura en la masa de aire y de la velocidad del viento. La zona de turbulencia en la atmósfera es muy variable, pero en general se encuentra entre los 100 a 1000 m de altura y está limitada en la parte superior por una capa de inversión que impide la difusión vertical más allá de la capa de turbulencia (Bovallius *et al.*, 1980).

En general, las aerobacterias son transportadas en microescala y mesoescala, dando origen a los ciclos diurnos y estacionales. El transporte en microescala se limita a intervalos de tiempo y espacio, del orden de una hora o menos de duración y pocos metros de distancia, y está determinado por el viento promedio y sus fluctuaciones de turbulencia. En el transporte en mesoescala, los intervalos de tiempo y espacio son de días y de algunos kilómetros; la dirección y la velocidad del viento varían tanto con la altura como con la localidad y generalmente las superficies sobre las que se realiza este transporte no son uniformes (Edmonds, 1979).

El transporte a gran escala incluye intervalos de tiempo y espacio lo suficientemente grandes para que la circulación sea global. En las aerobacterias este tipo de transporte está poco documentado, no obstante, se menciona que si las bacterias, o las

partículas que contienen bacterias, atraviesan la capa de inversión cuando son dispersadas (la cual se encuentra por encima de la capa de turbulencia), llegan a una capa con baja turbulencia y frecuentemente con velocidad del viento muy intensa (corriente de chorro), donde las condiciones para el transporte a gran escala se favorecen (Bovallius *et al.*, 1980).

Por otro lado, cuando el viento se encuentra en calma, las partículas pequeñas como las bacterias (entre 1-5  $\mu\text{m}$  de diámetro) tienden a sedimentarse. Sin embargo, durante condiciones de flujo laminar las bacterias pueden viajar largas distancias sin sedimentarse, debido a que su velocidad terminal de sedimentación es muy baja. Por lo tanto, en el caso de una sola bacteria o en agregados menores a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, la influencia de la sedimentación es limitada y no es un factor que impida significativamente su transporte a gran escala (Gregory, 1973; Bovallius, *et al.*, 1980).

La capacidad de producir endosporas o la presencia de pigmentos, favorece la dispersión de las bacterias a gran escala. Las bacterias esporuladas presentan un tiempo de reducción decimal (TRD, tiempo en que se reduce al 90% la viabilidad) extremadamente largo. Bacterias como *Flavobacterium* sp., *Sarcina* sp., *Serratia* sp. y *Erwinia* sp., encontradas en ambientes extramuros, tienen un TRD del orden de horas, mientras que para las bacterias patógenas frecuentemente es del orden de segundos a minutos (Dimmick y Akers, 1969).

### 2.3 OSMORREGULACIÓN DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Un factor importante para la permanencia de las bacterias en la atmósfera es la sobrevivencia de las mismas en el estado aerosolizado. La viabilidad de las aerobacterias depende del tipo de microorganismo y del estado de desarrollo del mismo, así como de diversas condiciones físicas, entre las que se encuentran: la luz ultravioleta (D'Aoust *et al.*, 1974; Fedorak y Westlake, 1978), la temperatura (Ehrlich *et al.*, 1970), la humedad atmosférica (McDade y Hall, 1964; Hatch y Dimmick, 1966), el oxígeno (Benbough, 1969), los contaminantes químicos en la atmósfera, como el  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{O}_3$  y el CO (Druett y Packmann, 1968; Lighthart, 1971; Lighthart, 1973) y la protección física dada por otros microorganismos o por el polvo (Dimmick y Akers, 1969).

Una de las principales causas de muerte de las aerobacterias, sobre todo de las Gram-negativas, es la deshidratación causada por la evaporación del agua, tanto de las partículas portadoras como de la propia célula. El grado de evaporación depende de la temperatura y de la humedad ambiental, así como de la naturaleza y concentración de los solutos en el aerosol. La evaporación del agua contenida en el aerosol puede

ocasionar un desbalance osmótico en la célula, por el incremento en la concentración de los solutos, generando un estrés osmótico a la célula. Se entiende por estrés osmótico al incremento o decremento en la concentración osmótica del ambiente de un organismo y se define como regulación osmótica u osmorregulación, al proceso activo llevado a cabo por los organismos para enfrentarse al estrés osmótico (Csonka, 1989).

### *Efecto de un choque hiper e hipo-osmótico*

La membrana citoplásmica de las bacterias es permeable al agua pero no a la mayoría de otros metabolitos, por lo que un choque hiper o hipo-osmótico causa una salida o una entrada de agua instantánea a la célula, acompañado de un decremento o un incremento en el volumen citoplasmático. De estos procesos, el choque hiper-osmótico es el más severo y puede ocasionar una plasmólisis, con la subsecuente reducción de la actividad citoplásmica del agua. Las proteínas y otras macromoléculas biológicas funcionan sólo con ciertos niveles de agua en la célula; fuera de estos límites algunas funciones celulares esenciales se dañan. Por lo tanto, la plasmólisis inhibe una variedad de procesos fisiológicos, que van desde la toma de nutrimentos hasta la replicación del ácido desoxirribonucleico (DNA). El agua dentro de la célula puede actuar también como solvente y como catalizador de diversas reacciones enzimáticas, ya que la tasa de reacción depende de la actividad del agua y de su asociación a biomoléculas.

### *Función de los solutos compatibles y osmoprotectores*

Las bacterias expuestas a un estrés osmótico, pueden responder al mismo incrementando la concentración de un número limitado de solutos, ya sea por síntesis o por transporte activo, con el fin de mantener el equilibrio osmótico. Estas moléculas pueden ser acumuladas en altas concentraciones dentro de la célula, sin alterar de manera significativa los procesos celulares, por lo que son llamados *solutos compatibles* (Brown y Simpson, 1972). Los principales solutos compatibles encontrados en las bacterias son los iones de  $K^+$ , los aminoácidos glutamato, glutamina, prolina y alanina; la amina cuaternaria glicinabetaina y los azúcares trealosa, la sacarosa y el glucosilglicerol (Flowers *et al.*, 1977; Imhoff, 1986; Yancey *et al.*, 1982). Algunos solutos compatibles no sólo atenúan el estrés osmótico, sino que se ha sugerido que establecen una interacción especial con macromoléculas celulares (como las proteínas), incrementando la estabilidad de las mismas. Los solutos que tienen esta propiedad son llamados *osmoprotectores*; dos de los más importantes son la prolina y la glicinabetaina.

### *Regulación genética*

El cambio en la presión osmótica influye en la inducción o represión de la expresión genética de los organismos. Los genes pueden ser inducidos a través de un superenrollamiento negativo del DNA, el cual puede incrementar la eficiencia con la cual los genes son transcritos a ácido ribonucleico mensajero (RNAm). La DNA girasa (codificada por el gen *gyr*) incrementa el superenrollamiento negativo, y la DNA topoisomerasa (codificada por el gen *top*) tiene el efecto opuesto. Mutantes de *gyr* y *top* afectan los genes sujetos a osmorregulación; mutantes de *osmZ* aumentan el superenrollamiento negativo y también afectan los genes osmorreguladores (Rosas *et al.*, 1994 b).

En la membrana externa se encuentran las porinas OmpC y OmpF. En condiciones de alta presión osmótica, la transcripción del gene *ompC* (que codifica para la proteína OmpC) predomina y la de *ompF* es reprimida; mientras que a bajas osmolaridades sucede lo contrario. Se desconocen las bases fisiológicas de esta regulación, pero se ha propuesto que OmpC produce un poro más pequeño que OmpF, lo cual daría una ventaja ante una concentración alta de solutos (Rosas, *et al.*, 1994 b). Las permeasas ProP y ProU también se estimulan bajo condiciones de estrés hiperosmótico, permitiendo la entrada de la prolina a la célula (Wood, 1988). Estos dos sistemas también regulan el transporte de la glicinbetaína, siendo el sistema ProU probablemente el más importante para el transporte de este soluto (May *et al.*, 1986). En el espacio periplásmico se encuentra una proteína codificada por el gen *proV*, a la cual se une la glicinbetaína y participa en su transporte.

En la membrana citoplásmica se registra el cambio en la turgencia celular, por medio de proteínas asociadas a la membrana. Las proteínas del sistema de genes *kdp* activan la entrada del ion K<sup>+</sup>, el cual participa en la restauración de la turgencia (Rhoads *et al.*, 1976). El gen *proU* codifica para un sistema de transporte de alta afinidad para la glicinbetaína. Genes del sistema *bet* participan en el transporte de colina, compuesto precursor de la glicinbetaína. En el citoplasma, el sistema de genes *bet* codifica para proteínas involucradas en la oxidación de la colina a glicinbetaína.

El estudio de la capacidad osmorreguladora de las bacterias es reciente y por su complejidad requiere de investigaciones más profundas. Se considera que existen otros sistemas de regulación independientes a los aquí mencionados; además, es de interés notar que algunos de los genes (*ompC*, *proU* y *tppB*) se inducen también en condiciones de anaerobiosis.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo General

Evaluar la distribución espacial y temporal de las bacterias coliformes, como un indicador de contaminación fecal en la atmósfera de la Ciudad de México.

#### Objetivos Particulares

- 1) Determinar el contenido de bacterias mesófilas cultivables y de bacterias Gram-negativas en las partículas suspendidas y depositadas de los ambientes intramuros (domésticos) y extramuros de diversas zonas de la Ciudad de México.
- 2) Conocer la proporción de bacterias coliformes con respecto a las bacterias Gram-negativas, aisladas tanto del aire como del polvo depositado.
- 3) Evaluar el uso de la glicinabetaina en la recuperación de las bacterias Gram-negativas aisladas del aire.
- 4) Identificar el género o especie de las bacterias coliformes aisladas.
- 5) Realizar el análisis antimicrobiano y serológico de las cepas de *Escherichia coli* aisladas.

## 4. ÁREA DE ESTUDIO

### Sitios de muestreo

El muestreo de aeropartículas se llevó a cabo en tres zonas de la Ciudad de México con diferente grado de urbanización (Fig.1) :

1. Delegación Gustavo A. Madero, zona urbano-industrial situada al norte de la ciudad, a 40 km del centro del Distrito Federal.
2. Delegación Cuauhtémoc, zona urbano-comercial situada en el centro de la ciudad.
3. Delegación Tlalpan, área residencial ubicada en el sureste de la ciudad, a 20 km del centro.

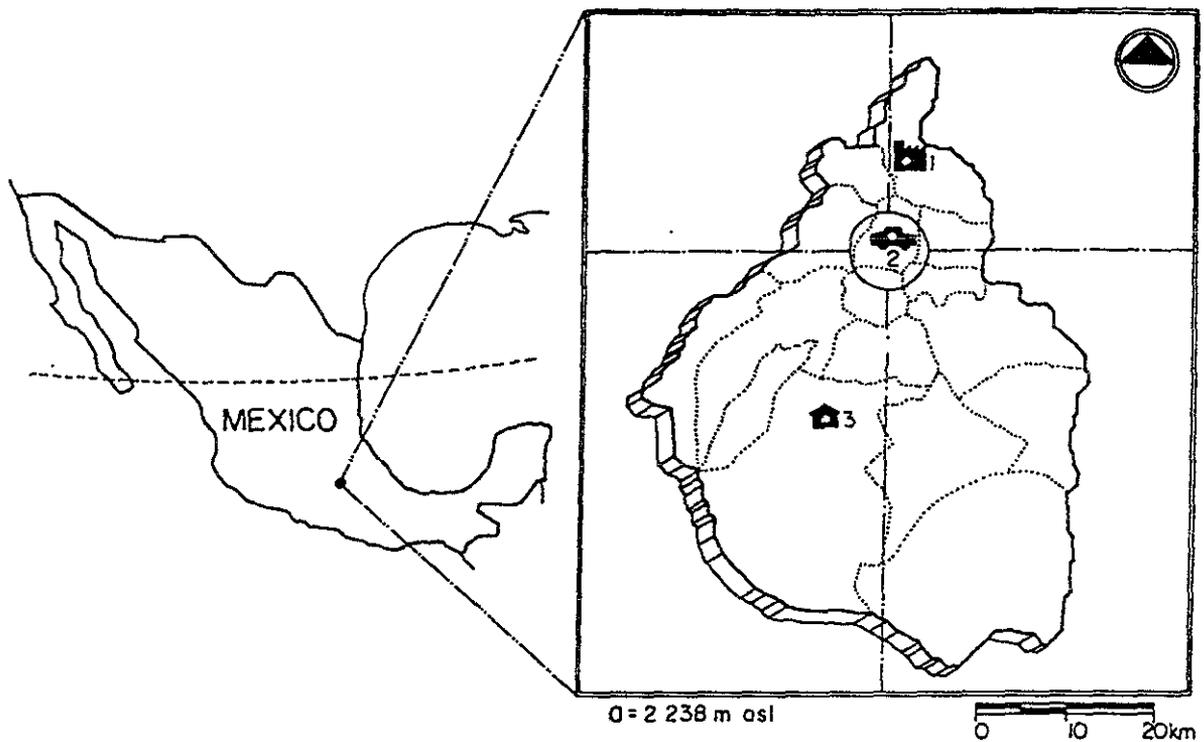
### Características climáticas de la ciudad de México

La cuenca de México está ubicada a una altura de 2250 msnm, rodeada de altas montañas especialmente hacia el sureste, sur y oeste, mientras que por el norte y noreste las elevaciones son relativamente menores. Debido a la latitud en que se encuentra ( $19^{\circ}30'$ ) el clima de la Ciudad de México se define como tropical de altura, es decir, aunque la temperatura es menguada por la elevada altura del valle, presenta otros rasgos climáticos característicos de los trópicos, como son la regularidad e intensidad de las lluvias.

Durante la estación seca con bajas temperaturas, la cuenca de México se encuentra bajo la influencia de las masas de aire polar, características de las regiones templadas ubicadas fuera de los trópicos, por lo que el clima de la Ciudad de México está determinado por los sistemas atmosféricos tropicales y extratropicales, distinguiéndose así dos estaciones climáticas bien definidas: la estación seca (noviembre-abril) y la estación lluviosa, de mayo a octubre (Jáuregui, 1987).

En la época de secas, el paso de las tormentas invernales asociadas a las masas de aire frío, originan un marcado descenso de la temperatura; además, el frente frío se caracteriza por un aumento en la nubosidad, lo que ocasiona lluvia ligera. Pero lo más frecuente es que las masas de aire polar continental sean bastante secas (sobre todo al final de la estación), lo que produce tiempo frío y ventoso con poca nubosidad. Al pasar los vientos por la cuenca de México, se levantan altas y densas cortinas de polvo, especialmente en la segunda mitad de este período (febrero a abril) (Jáuregui, 1987).

## Ciudad de México



## Sitios de muestreo:

1. Norte: área urbano-industrial
2. Centro: área urbano-comercial
3. Sur: área residencial

FIGURA 1. Localización de los sitios de muestreo.

A partir del mes de abril, la circulación atmosférica comienza a cambiar, debilitándose los vientos del oeste, al tiempo que se incrementa la corriente húmeda de los alisios. En plena estación lluviosa prevalecen en la cuenca los movimientos ascendentes y convergentes hasta la tropósfera media, compensados con flujo divergente en los altos niveles de la misma zona. Esta situación atmosférica propicia la formación de nubes convectivas que originan las lluvias de verano (Jáuregui, 1987).

## Zonas Climáticas

Dentro del área que ocupa la Ciudad de México, se pueden distinguir zonas con características climáticas contrastantes, aunque es difícil localizar sus fronteras ya que las variaciones de los elementos climáticos entre éstas son graduales. Sin embargo, es posible diferenciar cinco zonas climáticas dentro de la Ciudad de México, de las cuales son de interés para el presente trabajo la zona noreste, la zona del centro y la zona sur (Jáuregui, 1975).

### *Zona noreste*

Corresponde a la zona de suburbios del noreste de la ciudad, ubicados en gran parte sobre los suelos del antiguo lago de Texcoco. Ésta es una región con un gran número de fábricas, sobre todo en la porción norte y centro de la misma. En el extremo oriente se extiende una mancha urbana (Ciudad Netzahualcoyotl), caracterizada por tener alta densidad poblacional con bajos recursos económicos. La escasez de áreas verdes y la falta parcial de drenaje y pavimentación, ocasiona que durante la época de secas se levanten grandes nubes de polvo; durante la estación lluviosa, la deficiencia en el drenaje origina frecuentes inundaciones. Los niveles de contaminantes atmosféricos son más bajos en esta zona; sin embargo, es la región que recibe el impacto más violento por las tempestades de polvo. Los vientos son considerables y la radiación solar abundante e intensa; las heladas son muy frecuentes. La zona noreste de la ciudad se caracteriza por precipitaciones poco abundantes, entre 400 y 600 mm.

### *Zona del centro*

En esta área se registran las concentraciones de gases contaminantes (SO<sub>2</sub>, CO y óxidos de nitrógeno, entre otros) más altos de la ciudad, debido principalmente al intenso tráfico vehicular. Asimismo, la elevada densidad de edificios hace de esta región la menos ventilada del área urbana. Debido al efecto de la isla de calor, la humedad relativa es comparativamente más baja y las temperaturas bajo cero no se presentan. Ésta es una zona de transición entre la seca del este y la húmeda del sur y del oeste; la precipitación media anual varía de 600 a 700 mm.

### *Zona sur*

La zona sur presenta una baja densidad de fábricas, predominan las construcciones con espacios abiertos y zonas verdes, incluyendo un amplio bosque de 137 ha. Los niveles de contaminación son los más bajos de la ciudad. Es una zona bien ventilada, más húmeda que las dos anteriores, con abundante precipitación y es el área menos afectada por las tolvaneras. La zona suroeste se caracteriza por precipitación abundante en la estación de lluvia, con 700 a 1100 mm.

### **Estructura urbana de las delegaciones estudiadas**

#### 1) Delegación Gustavo A. Madero

Esta delegación se localiza al norte del Distrito Federal; tiene una superficie de 87 km<sup>2</sup>, equivalentes al 6.0% del total del área de la Ciudad de México. La mayor parte de la superficie de la delegación está destinada a usos urbanos. El uso habitacional predomina en el centro y el este de la delegación, mientras que el industrial se concentra en el oeste. Dentro del área urbanizada, 23 % corresponde a lotes baldíos, siendo la única reserva urbana de la delegación.

Un alto número de colonias de la delegación carecen de infraestructura y equipamiento urbano. El 20 % del área delegacional carece del servicio domiciliario de agua potable y el 42 % de las viviendas carece de servicio de drenaje. El sistema general de drenaje conduce las aguas residuales por los ríos Tlalnepantla, San Javier y Los Remedios, descargando en el gran canal de desagüe y en los interceptores del drenaje profundo. En la delegación se recogen diariamente 500 ton. de basura, pero quedan otras tantas en las calles. La insuficiencia en este servicio provoca que la basura se acumule y permanezca varias semanas en lugares inapropiados.

Las zonas de reserva ecológica se reducen al Parque Nacional del Tepeyac y al bosque de San Juan de Aragón. Los problemas de contaminación y deterioro ambiental son importantes y se dan en diferentes niveles: las aguas residuales poseen un grado de contaminación muy elevado; el suelo se halla contaminado por basura y material fecal, a causa del insuficiente servicio de recolección del gran canal; además, los ríos Tlalnepantla, San Javier y Los Remedios conducen aguas residuales a cielo abierto e inundan las áreas adyacentes, sobre todo en la época de lluvias. Las tolvaneras provenientes del este, la desforestación del Parque Nacional de Tepeyac, la erosión de la sierra de Guadalupe, así como las fuentes de contaminación fijas y móviles, deterioran la calidad del aire (García-Peralta, 1987).

## 2) Delegación Cuauhtémoc

La delegación Cuauhtémoc está ubicada en el área central del Distrito Federal y ocupa una superficie de 33 km<sup>2</sup>, lo que representa el 3.0% de la mancha urbana. La densidad de población de esta delegación es de 255 habitantes por ha., que es comparativamente elevada con relación a otras zonas del área metropolitana de la Ciudad de México. Las actividades correspondientes a los servicios y económicas (comercial) ocupan la mayor proporción del suelo de la delegación.

Esta delegación cuenta en su mayoría con un buen nivel de dotación de servicios, como suministro de agua potable, drenaje, alcantarillado y energía eléctrica. Sin embargo, en las colonias donde habitan los sectores de menores ingresos, existe escasez de agua y los servicios de drenaje son deficientes. Otro servicio deficiente es la recolección de basura, lo que genera una situación de deterioro. Esto, sumado a la emisión de gases y polvos, generados por los problemas de circulación y congestión vehicular (principalmente en el centro de la ciudad), la convierten en una de las zonas con mayor índices de contaminación. La delegación presenta, como característica fundamental, la escasez de áreas verdes, ya que existen sólo 0.56 m<sup>2</sup> por habitante, cuando el mínimo aceptable es de 2.5 m<sup>2</sup>/hab (Ziccardi, 1987).

## 3) Delegación Tlalpan

Tlalpan se localiza al sur del Distrito Federal; cuenta con una superficie de 305.47 km<sup>2</sup>, lo que la convierte en la delegación más extensa, representando el 20% del territorio total de la ciudad.

La delegación presenta unidades geomorfológicas, que la atraviesan o la circunscriben, las cuales inciden no sólo sobre las características climáticas de la delegación, sino sobre toda la cuenca de México. Entre estas formaciones se encuentran: la sierra del Ajusco, pedregal de Xitli, cinturón norte Ajusco-Teuhtli, cinturón central Topilejo-Milpa Alta y cinturón sur Cerro Pelado-Cerro Tilcuaya. Estas sierras permiten, en cierto grado, la recarga de acuíferos; además, algunas son sitios que por su riqueza forestal constituyen reservas de fauna y flora (como la sierra del Ajusco y el pedregal de Xitli).

La zona urbanizada de la delegación actualmente supera los 51.5 km<sup>2</sup> y se distribuye en primer lugar como uso habitacional. Cuenta también con un alto porcentaje de espacios abiertos, entre los que se encuentra el bosque de Tlalpan. Una gran parte del territorio delegacional está asignado a usos agrícolas (31.6 % del área total) y a la explotación forestal, es decir, a actividades rurales (Ibarra, 1987).

## 5. MATERIAL Y MÉTODO

### 5.1 MUESTREO DE EXTRAMUROS

#### Muestreo de aeropartículas viables

Los muestreos se llevaron a cabo durante 1991, simultáneamente en las tres zonas de estudio, entre las 9:00 y 10:00 a.m. En total se obtuvieron 40 muestras en cada área : 20 en la época de secas (febrero-abril) y 20 en la de lluvias (agosto-octubre).

La toma de muestras de aire se realizó por medio de impactadores de cascada para partículas viables de dos etapas (Graseby Andersen, Atlanta, Ga.), los cuales se colocaron en torres de aluminio a una altura de 2m sobre el nivel del suelo, manteniendo un flujo constante de aire de 28.3 l/min. (1 pie<sup>3</sup>/min), durante 15 min.

#### *Muestreador Andersen*

El muestreador volumétrico secuencial empleado se compone de dos placas de aluminio con 200 orificios cada una, cuyo diámetro es de 1.5 mm en la primer etapa y de 0.4 mm en la segunda. Las partículas suspendidas se distribuyen en las dos etapas de acuerdo a su diámetro aerodinámico. El diámetro de corte al 50% de eficiencia, para la etapa I del muestreador es de 8.0  $\mu\text{m}$ , para partículas esféricas de densidad uno (o su equivalente aerodinámico). Las partículas no-respirables (es decir que no penetran en el tracto respiratorio inferior) son colectadas en esta etapa del muestreador y las partículas de tamaño respirable < 5  $\mu\text{m}$  (que pueden penetrar en el tracto respiratorio inferior) son colectadas en la etapa II (Andersen Sampler Inc., 1984).

El muestreador está provisto de un orificio crítico que permite el paso de 1 pie<sup>3</sup> de aire por minuto, por medio de una bomba de vacío. Las partículas acarreadas en el flujo de aire son depositadas directamente sobre la superficie del medio de cultivo sólido, contenido en cajas Petri estándar (100 x 15 mm) que se colocan bajo cada etapa del muestreador (Anexo A : Lámina I)

#### *Medios de cultivo*

Como medio de impactación para las bacterias mesófilas cultivables, se usó agar de soya y tripticaseína (TSA ; Difco Laboratories, Detroit, Mich.), adicionado con 0.05 g/l

de cicloheximida (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), como inhibidor del crecimiento de hongos. Para el aislamiento de las bacterias Gram-negativas, se empleó agar de bilis rojo violeta (ABRV ; Oxoid, Hampshire, Inglaterra).

### Registro de parámetros meteorológicos

Al inicio y al final de cada muestreo se tomó la temperatura ambiental (bulbo seco y bulbo húmedo) con un psicrómetro de honda (Imperial Eastman de México), calculándose posteriormente la humedad relativa y la presión de vapor; se registraron también las condiciones atmosféricas de nubosidad y visibilidad. Los datos de partículas suspendidas totales (PST), partículas menores de 10µm (PM<sub>10</sub>), precipitación, dirección y velocidad del viento, se tomaron de la Red Automática y Manual de Monitoreo Ambiental, D.D.F.

### Análisis microbiológico

Las placas de agar impactadas se incubaron a 35°C durante 24-48 h. Después del tiempo de incubación, se hizo una estimación cuantitativa de las colonias en cada caja de Petri. A las colonias desarrolladas en ABRV se les aplicó la tinción de Gram y/o la prueba de KOH al 3% (Pérez *et al.*, 1987), para obtener la proporción de bacterias Gram-negativas colectadas durante los muestreos. Las colonias fermentadoras de lactosa se consideraron como bacterias coliformes totales (Mac Faddin, 1984; O'Leary, 1989). La determinación, a nivel de género, se realizó por medio de las siguientes pruebas bioquímicas para bacterias entéricas : agar de hierro y triple azúcar, oxidasa, citrato inorgánico, rojo de metilo, voges-proskauer, indol, H<sub>2</sub>S, urea, lisina descarboxilasa, fenilalanina, licuefacción de gelatina y motilidad (Murray *et al.*, 1984).

### Cálculo de bacterias en UFC/m<sup>3</sup>

Una vez realizado el recuento de las colonias desarrolladas, se corrigió el error de sobreposición en la cuenta microbiana según la fórmula de Niemela *et al.* (1985):

$$C = N \ln \frac{N}{N - P}$$

Donde:

C= Cuenta corregida de colonias por etapa

N= Número de orificios en cada placa del muestreador (200)

P= Número de orificios positivos (colonias desarrolladas)

De esta manera se obtuvo el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada etapa del muestreador. La suma de las colonias obtenidas en las dos etapas proporcionó el número total de partículas viables colectadas.

En vista de que la velocidad del flujo de aire se mantuvo constante a 1 pie<sup>3</sup> por minuto (28.3 l/min.), el volumen de aire aspirado es igual al número de minutos muestreados; por lo tanto, al dividir el número total de UFC entre el tiempo de muestreo, se obtuvo la concentración total de UFC/pie<sup>3</sup> de aire (Andersen Sampler Inc., 1984). Por último se realizó la transformación de pie<sup>3</sup> a m<sup>3</sup>, al multiplicar el resultado por 35.

$$\bar{X} \text{ UFC m}^{-3} = \frac{\text{UFC de todas las etapas (K)}}{t}$$

Donde:

t= Tiempo total de muestreo (min.)

K= Constante de conversión de pie<sup>3</sup> a m<sup>3</sup> (35)

## 5.2 MUESTREO DE INTRAMUROS

Durante 1994 se evaluó el contenido de bacterias en las partículas suspendidas y depositadas, en el interior y el exterior de 30 casas localizadas al sur de la Ciudad de México. Las muestras se tomaron en condiciones de inactividad en las viviendas, una vez durante el período de secas y una en lluvias, entre las 10:00 a las 12:00 a.m.

### Evaluación de bacterias en las partículas suspendidas

#### *Toma de muestras biológicas en el aire y análisis microbiológico*

El muestreo de aeropartículas se realizó a 2 m de altura con el impactador de cascada de dos etapas, de la misma manera y con los mismos medios de cultivo, que el muestreo realizado en extramuros, excepto que a ambos medios se les adicionó 5 mM

de glicinabetaína (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Como testigo, las aerobacterias fueron colectadas en los medios de cultivo sin el osmoprotector.

Las cajas expuestas se incubaron a 35°C durante 24 a 48 h; y se procesaron de manera similar a las de extramuros. Las bacterias Gram-negativas se caracterizaron a nivel de género o especie, por medio de las pruebas bioquímicas para bacterias entéricas señaladas anteriormente, o con el equipo de microtitulación API-20 E (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.).

## **Evaluación de bacterias en las partículas depositadas**

### *Muestreo de polvo*

El polvo depositado se colectó con una aspiradora (VK-121; Vorwerk, Madrid, España) dentro de bolsas estériles. Las muestras se tomaron sobre una superficie de 2 m<sup>2</sup> del suelo de la sala (principalmente de alfombras y tapetes) y del exterior de las casas (sobre superficies pavimentadas). El polvo colectado fue pasado a través de un tamiz #100, con una abertura de malla de 0.149 µm (Anexo A : Lámina II).

### *Cuantificación y análisis bacteriano*

Para la cuantificación de bacterias en el polvo se utilizó el método de dilución de placa (FAO, 1967). Se preparó una solución con 100 mg de polvo en 10 ml de agua de dilución (0.01% de tween 80, 1% de peptona bacteriológica, 2% de inositol; Hunter *et al.*, 1995) a partir de la cual se prepararon cuatro diluciones seriadas 1:10. Cada suspensión se agitó vigorosamente durante 2 min. con un vórtex (Thermolyne Corporation) y se dispersaron 200 µl de cada dilución sobre TSA y ABRV por duplicado. Las cajas se incubaron a 35°C durante 24 a 48 h. Las colonias desarrolladas se cuantificaron y los resultados se expresaron como UFC/gramo de polvo. Las colonias representativas de bacterias coliformes, desarrolladas en ABRV, se aislaron e identificaron con métodos bioquímicos, al igual que las bacterias obtenidas del aire.

### *Tubos múltiples de fermentación*

Paralelamente al método de dilución en placa, el polvo se analizó con la técnica de tubos múltiples de fermentación (TMF), haciendo uso de las mismas diluciones de polvo (American Public Health Association, 1985).

Cada suspensión bacteriana se sembró por triplicado en caldo lactosado (BBL, Cockeysville, MD) y se incubó durante 24-48 h a 37°C (prueba presuntiva). Los tubos con reacción positiva (producción de gas) se resembraron en caldo verde brillante bilis (BBL, Cockeysville, MD), y se incubaron a 37°C durante 24-48 h (prueba confirmativa para coliformes totales), y en caldo EC (*Escherichia coli*) (BBL, Cockeysville, MD), a 45°C durante 24-48 h en baño de agua (prueba confirmativa para coliformes fecales). Se cuantificaron los tubos positivos y los resultados se reportaron en términos del número más probable (NMP) de organismos presentes (American Public Health Association, 1985).

Por último, de los tubos de caldo EC positivos se tomó una muestra (2 o 3 asadas) y se sembró por estría en ABRV. Para confirmar la presencia de *Escherichia coli*, las bacterias desarrolladas se analizaron por técnicas bioquímicas: IMVIC (indol, rojo de metilo, voges-proskauer y citrato inorgánico), agar de hierro y triple azúcar, y oxidasa (O'Leary, 1989).

### **Análisis de resistencia antimicrobiana**

Todas las cepas de *Escherichia coli* aisladas del aire y del suelo, se sometieron a la prueba de susceptibilidad a antibióticos *in vitro*. Se utilizó un equipo UniScept KB Gram-negative/type 2 (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) compuesto por 19 antibióticos suspendidos en un medio de crecimiento y liofilizados, en dos diluciones (baja y alta concentración), cada placa contiene también un testigo de crecimiento (Anexo B). Para determinar la susceptibilidad de las *E. coli* a los antibióticos, cada pozo de la placa se inoculó con 100 µl de una suspensión estandarizada de la bacteria. La placa se incubó durante 18 a 24 h a 37°C y se registró la presencia o ausencia de crecimiento en cada pozo.

### *Preparación del inóculo*

A partir de un cultivo puro de bacterias, desarrollado en agar Mueller Hinton (Merck, Darmstadt Germany), incubado durante 18-24 h a 37°C, se tomó una colonia y se suspendió en 5 ml de solución salina estéril al 0.85% (pH 5.5-7.0). La suspensión resultante se estandarizó al equivalente de turbidez de 0.5 del tubo de McFarland. Se mezcló perfectamente el contenido del tubo y se realizó una dilución 1:100 del inóculo con solución salina al 0.85%, para tener una concentración final de  $1 \times 10^6$  UFC/ml, aproximadamente. A cada pozo de la microplaca con los diferentes antibióticos, se le colocaron 100 µl del inóculo, se cubrió la placa de UniScept KB con su cubierta plástica y se incubó durante 18-24 h a 37°C.

### *Interpretación de resultados*

Después de la incubación, la susceptibilidad de los microorganismos ante los diferentes antibióticos se determinó por su crecimiento, al observarse la turbidez del medio en los pozos.

La interpretación de los antimicrobianos se realizó de la siguiente manera:

- Resistente: crecimiento en las dos concentraciones.
- Intermedio: crecimiento en la concentración baja, pero no en la alta.
- Susceptible: ausencia de crecimiento en ambas concentraciones.

### **Caracterización serológica**

Las cepas de *Escherichia coli*, aisladas de las muestras de polvo y de aire, se caracterizaron serológicamente en el Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se utilizó antisuero de conejo (SERUNAM, México) contra 175 antígenos somáticos (O) y 56 antígenos flagelares (H).

## **5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó con el programa de cómputo STATGRAPHICS 2.6. Todas las pruebas estadísticas realizadas se compararon con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . Los datos de aerobacterias fueron analizados con el fin de identificar su probable distribución, para lo cual se construyeron histogramas de frecuencia y se aplicaron las pruebas de ajuste de Chi-cuadrada y de Kolmogorov-Smirnov (Harnett y Murphy, 1987). Los resultados mostraron que los datos no transformados, no presentaron una distribución normal; además, el número de datos con el que se trabajó generalmente fue  $<30$ , por lo que se optó por usar como medida de tendencia central a la mediana y se emplearon las pruebas estadísticas no-paramétricas de Mann-Whitney, para la comparación entre grupos de datos, y el coeficiente de correlación por intervalos de Spearman, para el análisis de correlación entre 2 o más variables (Freund y Manning, 1989).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 AMBIENTE EXTRAMUROS

En el presente trabajo, el número de aerobacterias cultivables obtenidas en las tres zonas estudiadas fueron extremadamente variables a lo largo del período anual de muestreo. Los niveles de bacterias mesófilas cultivables (BMC) fluctuaron entre 20 UFC/m<sup>3</sup> a 5 x10<sup>3</sup> UFC/m<sup>3</sup> (Tabla 1). Las bacterias Gram-negativas (BGN) se aislaron en el 68% al 100% de las muestras, en concentraciones desde 2 UFC/m<sup>3</sup> hasta 465 UFC/m<sup>3</sup> de aire. Los valores más altos de bacterias coliformes totales (BCT) se obtuvieron en las zonas norte y centro de la ciudad.

TABLA 1. Concentraciones de aerobacterias cultivables (UFC/m<sup>3</sup>) colectadas en las tres zonas de estudio.

| Zona                            | n  | Mínima | Máxima | Mediana | Frecuencia de aislamiento (%) |
|---------------------------------|----|--------|--------|---------|-------------------------------|
| Bacterias Mesófilas Cultivables |    |        |        |         |                               |
| Norte                           | 40 | 115    | 5287   | 816     | 100                           |
| Centro                          | 40 | 250    | 4359   | 874     | 100                           |
| Sur                             | 40 | 20     | 5470   | 244     | 100                           |
| Bacterias Gram-negativas        |    |        |        |         |                               |
| Norte                           | 40 | 4      | 92     | 22      | 100                           |
| Centro                          | 40 | 2      | 448    | 38      | 100                           |
| Sur                             | 40 | ND     | 465    | 5       | 68                            |
| Bacterias Coliformes Totales    |    |        |        |         |                               |
| Norte                           | 40 | ND     | 74     | 4       | 60                            |
| Centro                          | 40 | ND     | 76     | 4       | 58                            |
| Sur                             | 40 | ND     | 22     | 0       | 40                            |

ND= No detectable

Las concentraciones de aerobacterias obtenidas en el norte y centro de la ciudad fueron muy similares, ya que estadísticamente no se encontró diferencia significativa en los niveles de BMC y BCT, registradas en ambas zonas, únicamente en el de BGN (Tabla 2). En cambio, se obtuvo una diferencia significativa entre las concentraciones de todos los tipos de aerobacterias colectadas en estas zonas con respecto al área sur.

TABLA 2. Comparación estadística entre las concentraciones de aerobacterias obtenidas en las diferentes zonas de estudio.

| Zona   | Centro |       |      | Sur   |       |       |
|--------|--------|-------|------|-------|-------|-------|
|        | BMC    | BGN   | BCT  | BMC   | BGN   | BCT   |
| Norte  | 0.42   | 2.02* | 0.25 | 4.63* | 2.84* | 2.32* |
| Centro | ----   | ----  | ---- | 4.52* | 3.65* | 2.25* |

BMC : Bacterias mesófilas cultivables ; BGN : Bacterias Gram-negativas ; BCT : Bacterias coliformes totales.

Prueba de Mann-Whitney :  $|Z| > 1.96 =$  Muestras diferentes ; \*  $p < 0.05$

Las BCT representaron el 29.3, 21.1 y 8.2 %, del total de BGN aisladas en el norte, centro y sur, respectivamente. La mayor parte de las aerobacterias cultivables estuvieron compuestas por cocos y bacilos Gram-positivos. Las bacterias Gram-negativas, en su mayoría, se constituyeron por bacilos Gram-negativos no fermentadores (Tabla 3), entre los que se incluyen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*. Dentro de las bacterias coliformes, *Enterobacter* fue el género más abundante en las tres áreas estudiadas, y se logró aislar *Escherichia coli* (principalmente durante la época de secas) con una abundancia aproximada del 2 al 5% del total de bacterias Gram-negativas determinadas.

En relación a la variación estacional de las aerobacterias, estadísticamente sólo en el sur de la ciudad se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de BMC colectadas durante la época de secas y de lluvias (Tabla 4). Con respecto a las BGN, en las tres zonas de estudio se obtuvieron niveles de aerobacterias significativamente diferentes entre los dos períodos de muestreo.

TABLA 3. Abundancia relativa (%) de las bacterias Gram-negativas determinadas en las tres áreas de estudio.

| Género                  | Zona de muestreo |        |      |
|-------------------------|------------------|--------|------|
|                         | Norte            | Centro | Sur  |
| <i>Aeromonas</i>        | 6.4              | 5.5    | 10.2 |
| <i>Citrobacter</i>      | 0.0              | <1.0   | 0.0  |
| <i>Enterobacter</i>     | 48.0             | 46.4   | 24.2 |
| <i>Escherichia coli</i> | 4.6              | 4.9    | 2.1  |
| <i>Klebsiella</i>       | 0.0              | <1.0   | 0.0  |
| <i>Proteus</i>          | <1.0             | 0.0    | 0.0  |
| <i>Serratia</i>         | 3.7              | 2.1    | 6.3  |
| No fermentadoras        | 28.6             | 32.0   | 48.7 |
| No determinadas         | 7.5              | 8.5    | 8.4  |

TABLA 4. Comparación estadística (prueba de Mann-Whitney) entre las concentraciones de aerobacterias aisladas durante la época de secas y de lluvias.

| ZONA   | Z     |       |
|--------|-------|-------|
|        | BMC   | BGN   |
| Norte  | 1.34  | 3.87* |
| Centro | 0.37  | 4.57* |
| Sur    | 4.67* | 5.23* |

BMC: Bacterias mesófilas cultivables; BGN: Bacterias Gram-negativas.

$|Z| > 1.96 =$  Muestras diferentes; \*  $p < 0.05$

La distribución de las aerobacterias en las etapas del muestreador Andersen se muestra en la figura 2. Las BMC se impactaron principalmente en la fracción no respirable (partículas con un diámetro aerodinámico  $>5 \mu\text{m}$ ), en porcentajes aproximados del 50-70%. Las BGN y las BCT, también se colectaron en su mayoría en la etapa no respirable, y sólo alrededor del 20% se depositó en la fracción respirable (partículas  $<5 \mu\text{m}$ ).

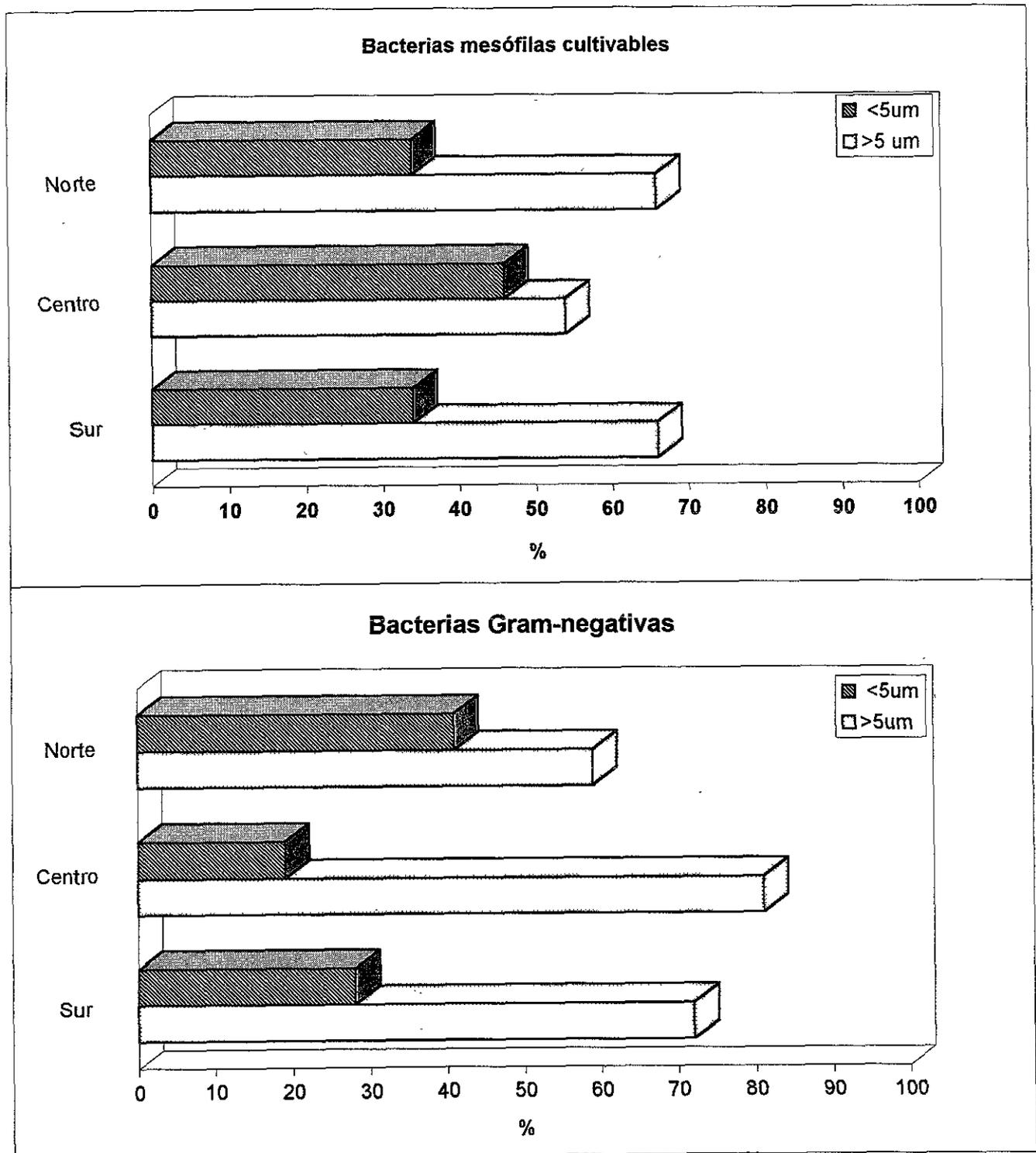


FIGURA 2. Distribución por tamaños de las aerobacterias en el muestreador Andersen (<math> <5\mu\text{m}</math> : fracción respirable ; >math> >5\mu\text{m}</math> : fracción no respirable).

Durante el período de secas, dominaron los vientos procedentes del este y noreste. En la época de lluvias, en el norte y sur de la ciudad, los vientos dominantes provinieron del norte y noroeste, y en el centro dominaron los del suroeste (Figuras 3 a 5). Las concentraciones más altas de aerobacterias se obtuvieron durante la época de secas, mientras que en el período de lluvias, las bacterias suspendidas en la atmósfera disminuyeron ligeramente en las zonas norte y centro, en tanto que en el área sur esta disminución fue más marcada, sobre todo en las concentraciones de bacterias Gram-negativas.

En la tabla 5 se presentan los valores de los parámetros meteorológicos registrados durante los muestreos. La humedad relativa fluctuó entre 9.8-10.1 % durante la época de secas y de 61.1-80.3 % en lluvias. Las normas de calidad del aire para PST ( $260 \mu\text{g}/\text{m}^3/24 \text{ h}$ ) y  $\text{PM}_{10}$  ( $150 \mu\text{g}/\text{m}^3/24 \text{ h}$ ) (Ciceros, 1991) se excedieron durante el período de secas en un 25% y 20% de los días de muestreo, en el norte y centro de la ciudad respectivamente. En la zona sur no se sobrepasó ninguno de los dos estándares en los días de muestreo.

TABLA 5. Valores de algunos factores ambientales y de partículas suspendidas, registrados durante los muestreos.

| Valor  | Temperatura<br>(°C) | Humedad<br>relativa (%) | PST<br>( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) | $\text{PM}_{10}$<br>( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) |
|--------|---------------------|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------|
| NORTE  |                     |                         |                                     |                                                  |
| Mínimo | 18.8                | 10.1                    | 134                                 | 59                                               |
| Máximo | 24.4                | 80.3                    | 358                                 | 255                                              |
| Media  | 21.8                | 49.3                    | 218.2                               | 118.3                                            |
| CENTRO |                     |                         |                                     |                                                  |
| Mínimo | 17.5                | 9.8                     | 94                                  | 57                                               |
| Máximo | 26.3                | 63.5                    | 393                                 | 225                                              |
| Media  | 20.8                | 40.4                    | 181.9                               | 107.5                                            |
| SUR    |                     |                         |                                     |                                                  |
| Mínimo | 13.9                | 10.1                    | 36                                  | 23                                               |
| Máximo | 22.8                | 61.1                    | 191                                 | 107                                              |
| Media  | 20.7                | 40.1                    | 111.2                               | 59.9                                             |

PST : partículas suspendidas totales ;  $\text{PM}_{10}$  : partículas < 10  $\mu\text{m}$ .

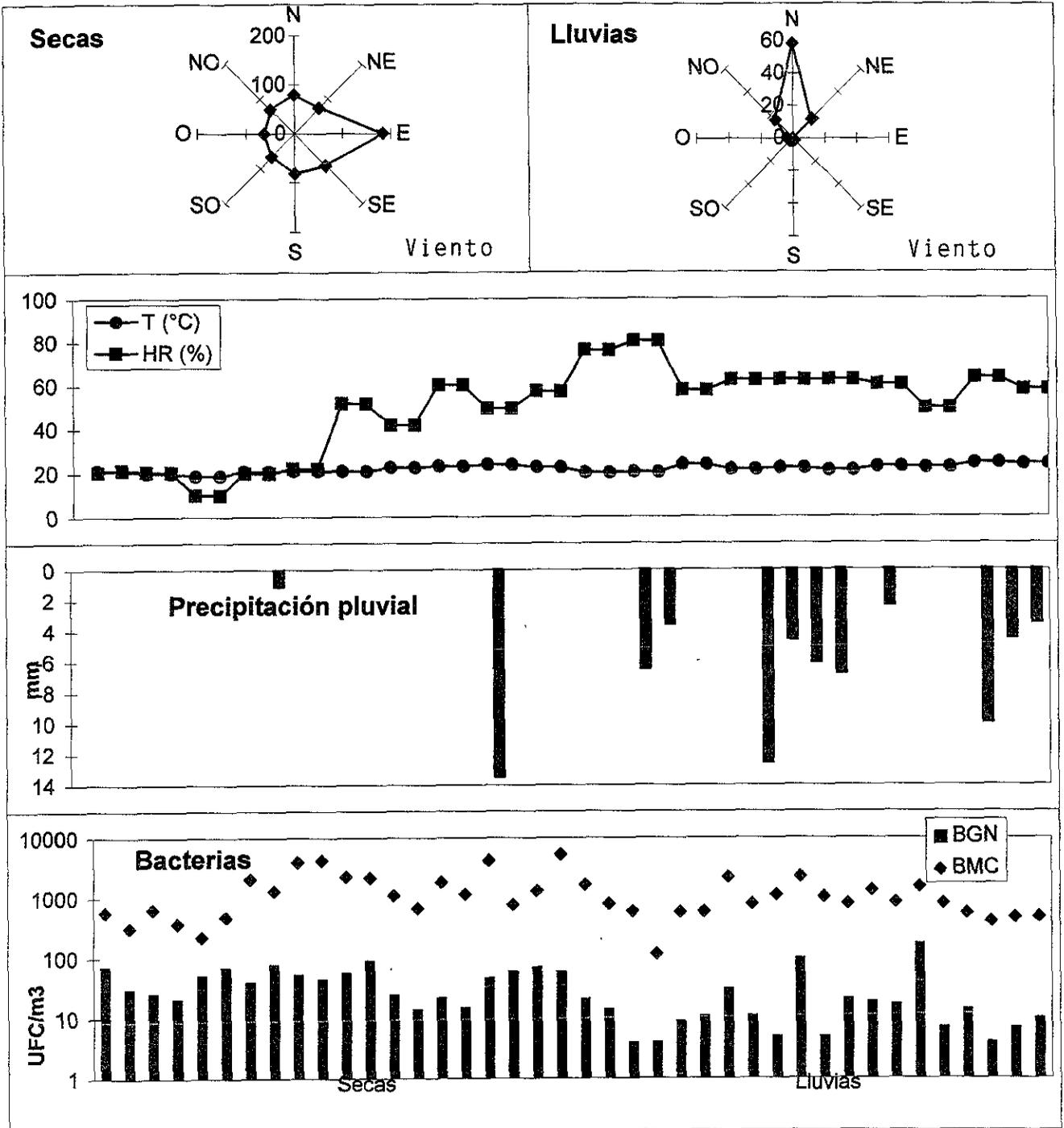


FIGURA 3. Variación estacional de las concentraciones de aerobacterias y algunos factores meteorológicos en la zona norte. HR : humedad relativa ; T : temperatura .

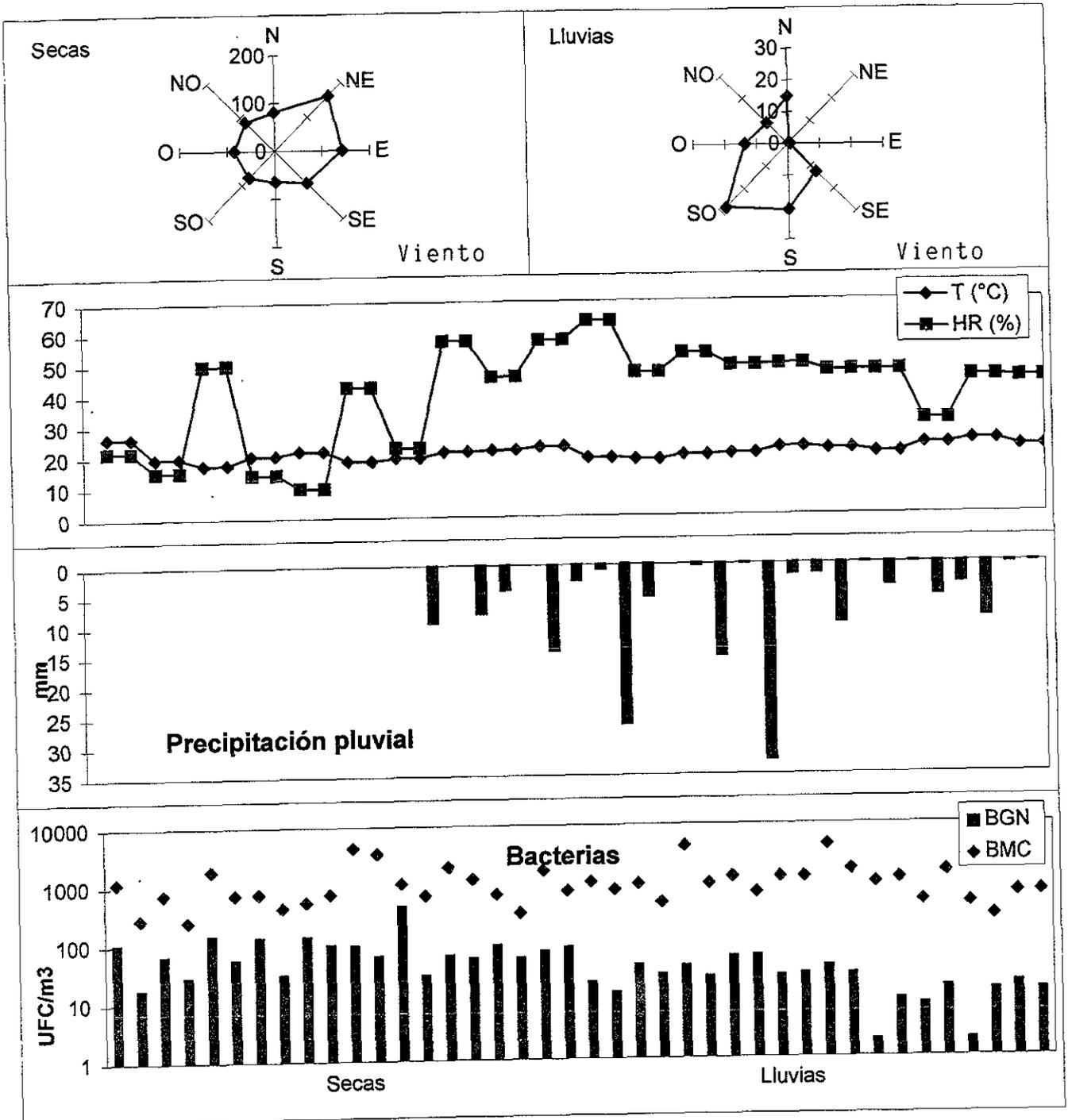


FIGURA 4. Variación estacional de las concentraciones de aerobacterias y algunos factores meteorológicos en la zona centro. HR : humedad relativa ; T : temperatura.

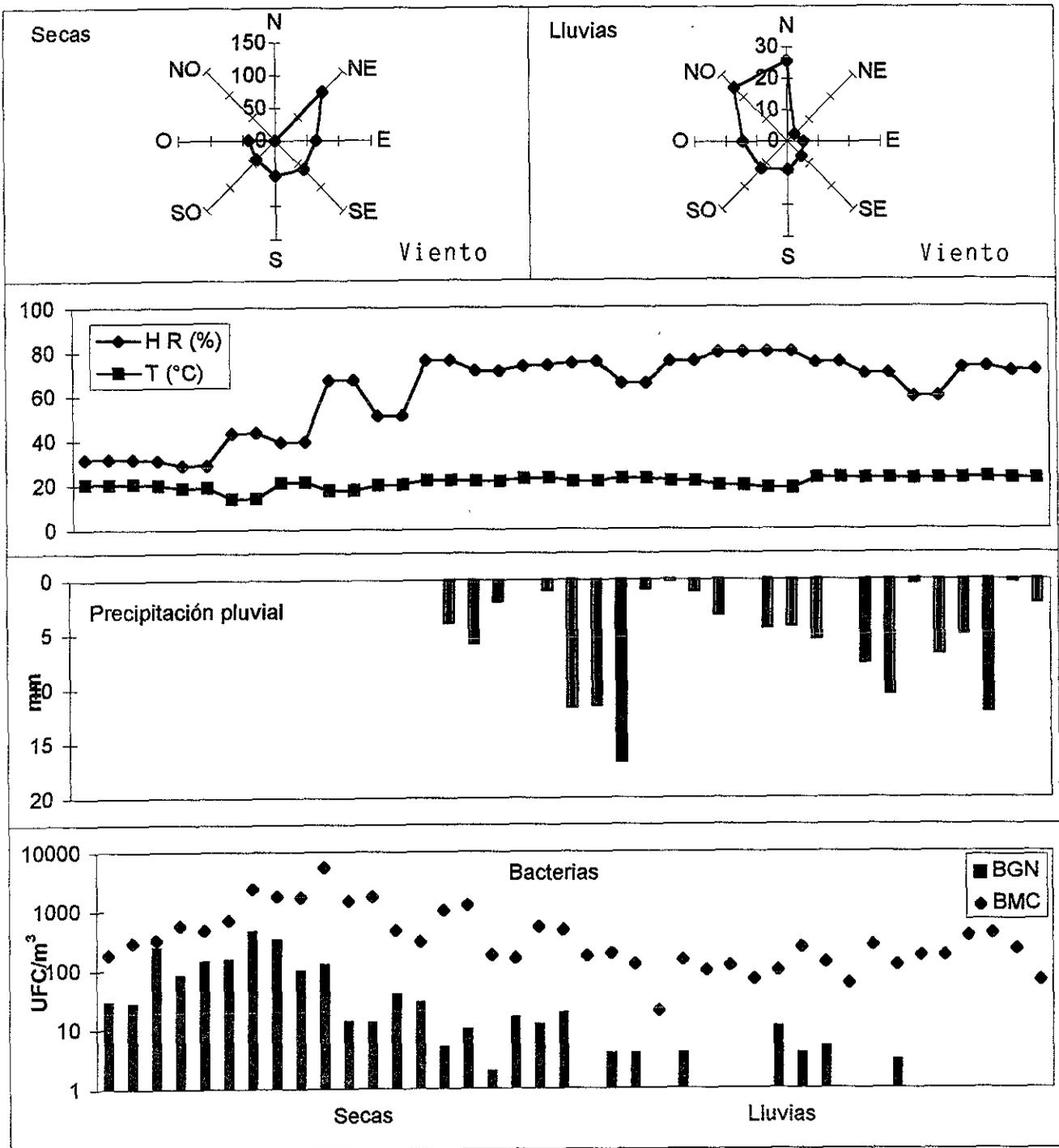


FIGURA 5. Variación estacional de las concentraciones de aerobacterias y algunos factores meteorológicos en la zona sur. HR : humedad relativa ; T : temperatura.

Los datos de aerobacterias obtenidos en este estudio se correlacionaron con algunos factores meteorológicos y con las concentraciones de partículas suspendidas en la atmósfera (Tabla 6). En relación a los parámetros meteorológicos, no se presentó una correlación consistente entre éstos y las concentraciones de partículas viables en la atmósfera. En el norte, las BGN y BCT correlacionaron negativamente sólo con la humedad relativa. En el sur, se obtuvieron correlaciones negativas significativas ( $p < 0.05$ ) entre los diversos grupos de aerobacterias y los parámetros de temperatura y humedad relativa. Con respecto a las correlaciones entre las concentraciones de aerobacterias y las de PST y  $PM_{10}$ , éstas fueron positivas en las tres áreas de estudio.

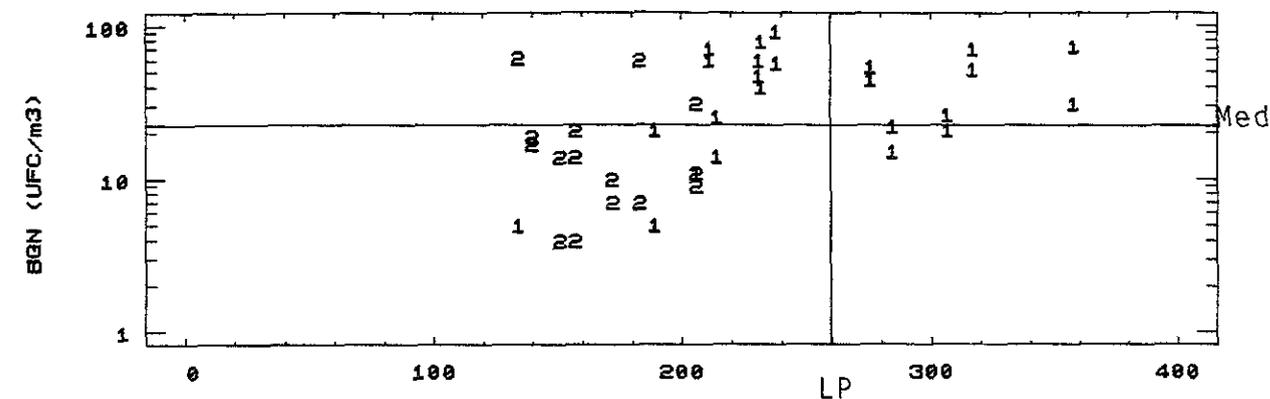
TABLA 6. Valores del coeficiente de correlación de Spearman entre las concentraciones de aerobacterias y algunos factores ambientales.

| Bacterias | Temperatura | Humedad relativa | PST   | $PM_{10}$ |
|-----------|-------------|------------------|-------|-----------|
| NORTE     |             |                  |       |           |
| BMC       | 0.004       | -0.02            | 0.007 | 0.03      |
| BGN       | -0.24       | -0.60*           | 0.52* | 0.46*     |
| BCT       | -0.26       | -0.64*           | 0.67* | 0.63*     |
| CENTRO    |             |                  |       |           |
| BMC       | -0.23       | 0.25             | -0.22 | -0.14     |
| BGN       | -0.22       | -0.16            | 0.32* | 0.42*     |
| BCT       | -0.02       | -0.16            | 0.46* | 0.48*     |
| SUR       |             |                  |       |           |
| BMC       | -0.38*      | -0.39*           | 0.58* | 0.27      |
| BGN       | -0.57*      | -0.55*           | 0.68* | 0.41*     |
| BCT       | -0.50*      | -0.58*           | 0.56* | 0.44*     |

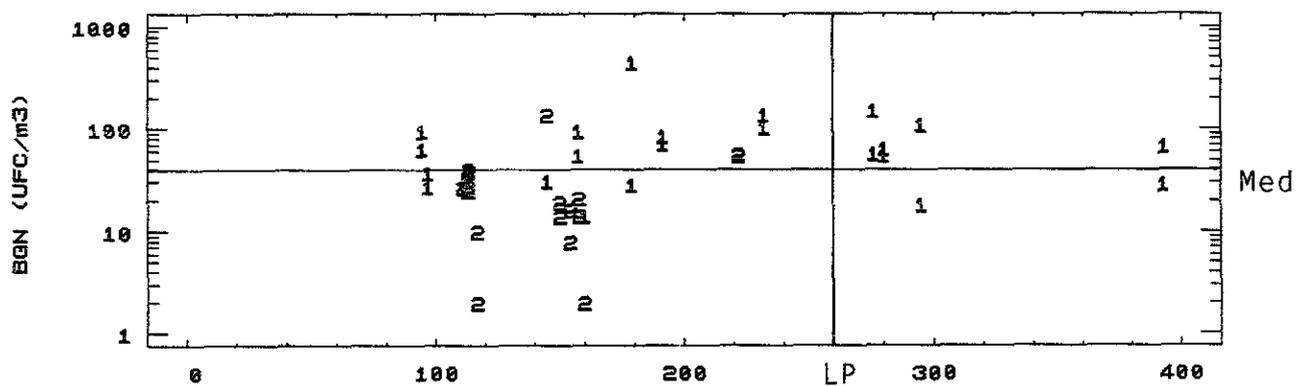
BMC : bacterias mesófilas cultivables, BGN : bacterias Gram-negativas ; BCT : bacterias coliformes totales ; PST : partículas suspendidas totales ;  $PM_{10}$  : partículas  $< 10 \mu m$ .

\*  $p < 0.05$

En las figuras 6 y 7 se presenta la distribución de las BGN, asociada a las PST y  $PM_{10}$ . Se observa que la presencia de BCT se relacionó con los niveles más altos de BGN (concentraciones que sobrepasaron el valor de la mediana). De igual manera, todos los muestreos donde se registraron concentraciones de partículas suspendidas mayores a la Norma de Calidad del Aire ( $260 \mu\text{g m}^{-3}/24 \text{ h}$  para PST y  $150 \mu\text{g m}^{-3}/24\text{h}$  para  $PM_{10}$ ) se asociaron con la presencia de coliformes totales.



CENTRO



SUR

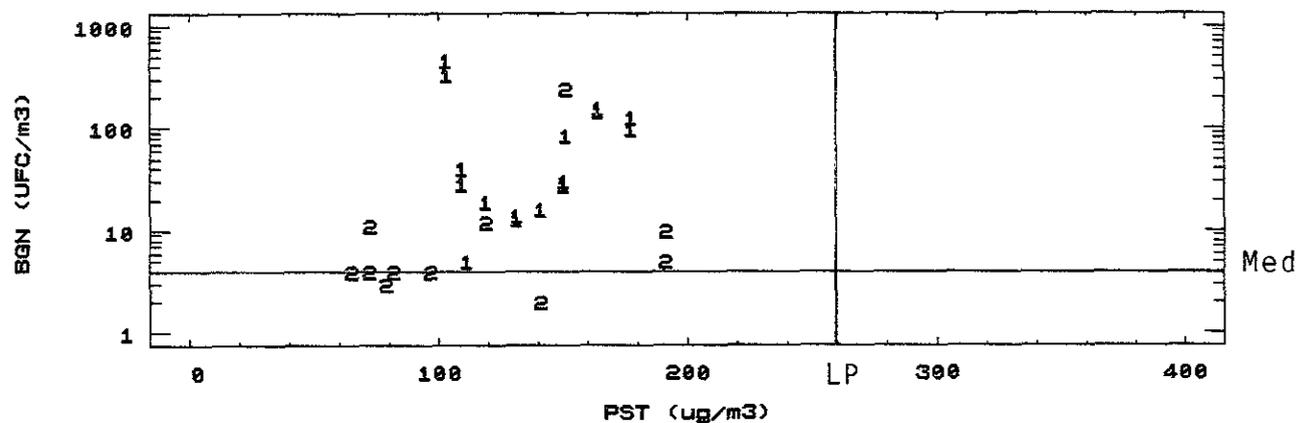
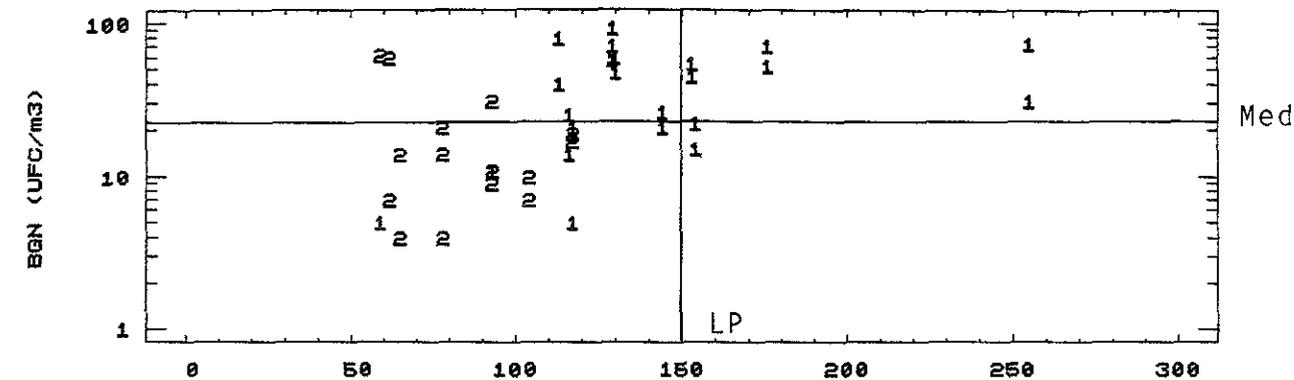
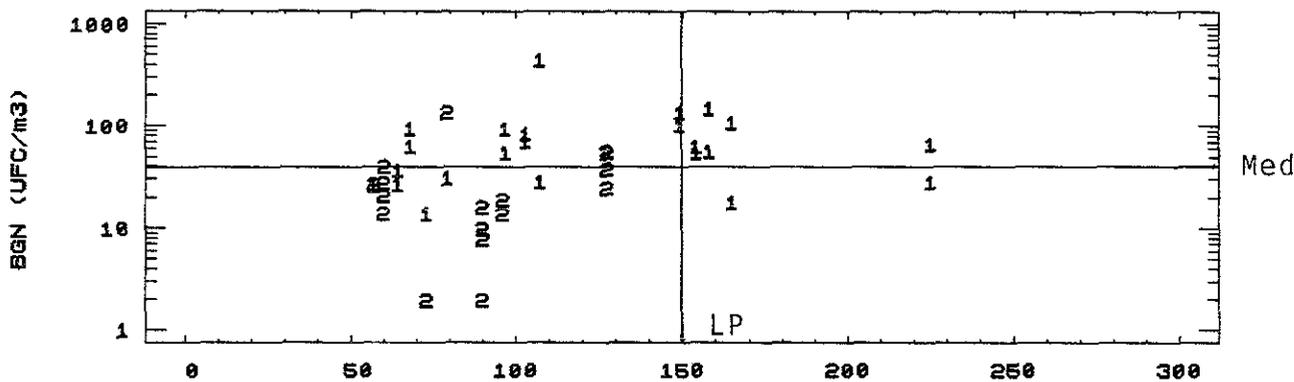


FIGURA 6. Asociación de las bacterias Gram-negativas (BGN) a las partículas suspendidas totales (PST). 1 : presencia de bacterias coliformes totales (BCT) ; 2 : ausencia de BCT ; LP : límite permisible ; Med : mediana.



CENTRO



SUR

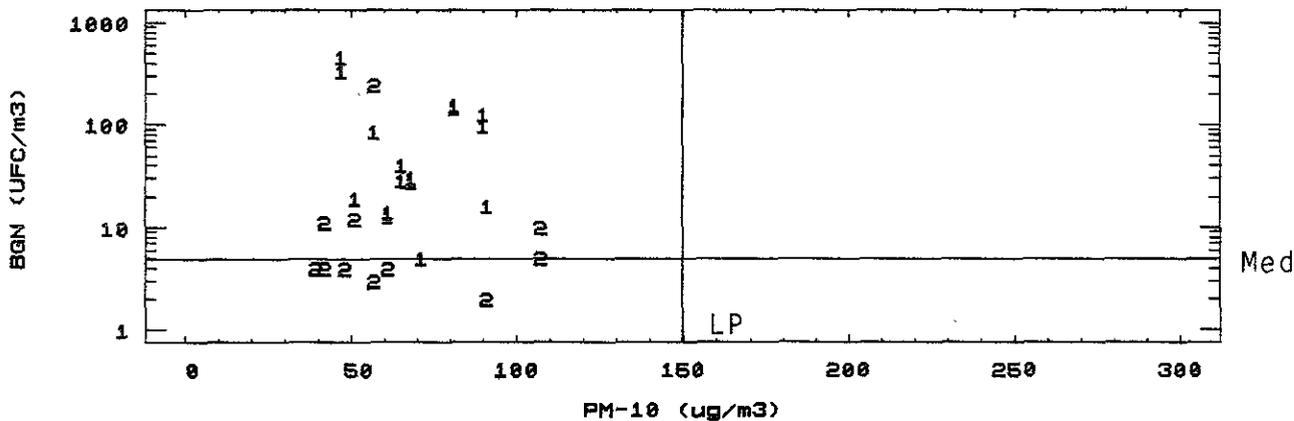


FIGURA 7. Asociación de las bacterias Gram-negativas (BGN) a las partículas suspendidas menores de 10  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ). 1 : presencia de bacterias coliformes totales (BCT) ; 2 : ausencia de BCT ; LP : límite permisible ; Med : mediana.

## 6.2 AMBIENTE INTRAMUROS

Los resultados obtenidos en esta segunda etapa del estudio, mostraron una amplia variación en la concentración de bacterias colectadas en las diferentes viviendas. En el aire, los niveles de BMC se encontraron en su mayoría entre  $10^2$  a  $10^3$  UFC/m<sup>3</sup>; en el polvo, el número total de bacterias fluctuó entre  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g.

En la Tabla 7 se muestra un resumen estadístico de las concentraciones de bacterias colectadas del aire y del polvo. En general, el número de aerobacterias obtenidas en los medios adicionados con glicinabetaína (GB) fue mayor al registrado en los medios carentes de la misma, sin embargo, estadísticamente no se obtuvo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las concentraciones de aerobacterias aisladas con o sin el osmoprotector (prueba de Mann-Whitney, datos no presentados).

TABLA 7. Concentración de bacterias aisladas del aire y del polvo en los ambientes intra y extramuros.

| BACTERIAS                                          | INTRAMUROS |       | EXTRAMUROS |       | TASA I/E  |      |
|----------------------------------------------------|------------|-------|------------|-------|-----------|------|
|                                                    | Med        | Max   | Med        | Max   | $\bar{x}$ | % >1 |
| <b>AIRE (UFC m<sup>-3</sup>)</b>                   |            |       |            |       |           |      |
| Mesófilas cultivables                              |            |       |            |       |           |      |
| TSA +GB                                            | 363        | 2998  | 92         | 2976  | 4         | 73.3 |
| TSA                                                | 238        | 1370  | 83         | 2500  | 4         | 78.3 |
| Gram-negativas                                     |            |       |            |       |           |      |
| ABRV +GB                                           | 4          | 109   | 2          | 34    | 34        | 86.7 |
| ABRV                                               | 2          | 54    | 2          | 12    | 29        | 80.0 |
| <b>POLVO (UFC x 10<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b> |            |       |            |       |           |      |
| Mesófilas cultivables                              | 5700       | 73200 | 5325       | 65000 | 3         | 50.0 |
| Gram-negativas                                     | 780        | 5960  | 135        | 3201  | 38        | 75.0 |

TSA : agar de soya tripticaseína ; ABRV : agar de bilis rojo violeta ; GB : glicinabetaína ; Med : mediana ; Max : máximo.

Las concentraciones de bacterias mesófilas cultivables (colectadas en el medio con GB) suspendidas en la atmósfera, fluctuaron entre 5 a 3000 UFC/m<sup>3</sup>, aproximadamente. Los niveles de aerobacterias en la mayoría de las viviendas fueron más elevados en intramuros que en extramuros. En el 73% de las casas, las concentraciones de BMC presentaron una relación intramuros / extramuros (I/E) mayor a 1. En el caso de las BGN esta relación fue >1 en el 86% de las viviendas (muestras con GB). En el polvo, las concentraciones de BMC obtenidas en intramuros variaron entre 14x10<sup>4</sup> a 73x10<sup>6</sup> UFC/g (Tabla 7); el valor de la mediana fue muy similar en los dos ambientes. Con respecto a las BGN, las concentraciones fueron superiores en el interior de las casas, con una tasa I/E >1 del 75%.

La frecuencia de aislamiento y la abundancia relativa de las BGN colectadas del aire fue similar en los medios de cultivo con y sin GB (Tabla 8).

TABLA 8. Incidencia de las bacterias Gram-negativas aisladas del aire y del polvo.

| Microorganismos                      | Medio de cultivo  | Intramuros                |                     | Extramuros                |                     |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
|                                      |                   | Frecuencia de aislamiento | Abundancia relativa | Frecuencia de aislamiento | Abundancia relativa |
| AIRE                                 |                   |                           |                     |                           |                     |
| BGN totales <sup>1</sup>             | ABRV+GB           | 71.7                      | 2.7                 | 48.4                      | 1.2                 |
|                                      | ABRV              | 73.4                      | 2.8                 | 56.7                      | 1.9                 |
| Enterobacteriaceas <sup>2</sup>      | ABRV+GB           | 53.6                      | 39.5                | 17.9                      | 23.1                |
|                                      | ABRV              | 44.5                      | 25.9                | 13.9                      | 14.5                |
| <i>Escherichia coli</i> <sup>2</sup> | ABRV+GB           | 7.1                       | 1.7                 | 1.8                       | 1.4                 |
|                                      | ABRV              | 0                         | 0                   | 0                         | 0                   |
| Otras BGN <sup>2</sup>               | ABRV+GB           | 60.7                      | 60.5                | 41.1                      | 76.9                |
|                                      | ABRV              | 58.4                      | 74.1                | 47.2                      | 85.5                |
| POLVO                                |                   |                           |                     |                           |                     |
| BGN totales <sup>1</sup>             | ABRV              | 100                       | 22.9                | 100                       | 9.6                 |
| Enterobacteriaceas <sup>2</sup>      | ABRV              | 78.6                      | 47.9                | 62.5                      | 47.7                |
| <i>Escherichia coli</i>              | ABRV <sup>2</sup> | 33.9                      | 2.6                 | 14.3                      | 1.8                 |
|                                      | TMF <sup>3</sup>  | 41.1                      | 15.5                | 17.9                      | 14.0                |
| Otras BGN <sup>2</sup>               | ABRV              | 76.8                      | 52.1                | 75.0                      | 52.3                |

Abundancia relativa: (1) con respecto a mesófilas cultivables; (2) con respecto a Gram-negativas totales; (3) con respecto a coliformes totales.

ABRV : agar de bilis rojo violeta ; TMF : tubos múltiples de fermentación ; GB : glicinabetaína

Las BGN representaron el 2.7% del total de aerobacterias mesófilas cultivables aisladas en intramuros y el 1.2% de extramuros (muestras con GB). *Escherichia coli* sólo se logró recuperar en el medio de cultivo adicionado con GB, representando el 1.7% del total de BGN aisladas en intramuros y el 1.4% del exterior (Tabla 8). En las muestras de polvo, la proporción de BGN con respecto a las BMC fue mayor en intramuros (22.9%) que en extramuros (9.6%). *E. coli* se aisló con mayor frecuencia en el interior de las casas, siendo aún mayor la frecuencia de aislamiento usando la técnica de tubos múltiples de fermentación (41.1%), que la inoculación de la muestra en las placas de agar (33.9%).

En la Tabla 9 se presenta la abundancia relativa de las bacterias coliformes determinadas. *Enterobacter* fue el género con mayor incidencia, tanto en el aire como en el polvo, representando alrededor del 60-80% del total de las enterobacterias; *Klebsiella* sólo se encontró en intramuros, representando un alto porcentaje de las bacterias entéricas aisladas del aire (22.3 %).

TABLA 9. Abundancia relativa (%) de las bacterias coliformes aisladas de las partículas suspendidas y depositadas.

| Microorganismos           | Aire       |            | Polvo      |            |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|
|                           | Intramuros | Extramuros | Intramuros | Extramuros |
| <i>Citrobacter</i>        | ----       | ----       | 0.8        | 1.7        |
| <i>Enterobacter spp.</i>  | 10.2       | 8.9        | 21.8       | 21.0       |
| <i>E. aerogenes</i>       | ----       | ----       | 0.2        | 9.2        |
| <i>E. agglomerans</i>     | 25.1       | 35.3       | 24.5       | 20.4       |
| <i>E. cloacae</i>         | 4.3        | 5.9        | 1.5        | 10.0       |
| <i>E. hafniae</i>         | 19.0       | 26.5       | 24.1       | 24.4       |
| <i>Escherichia coli</i>   | 4.3        | 2.8        | 5.5        | 3.9        |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 22.3       | ----       | 6.9        | ----       |
| <i>Serratia</i>           | 14.8       | 20.6       | 14.7       | 9.4        |

En la figura 8 se muestra la distribución por tamaños de las aerobacterias colectadas en el muestreador Andersen. Se observa que la mayor proporción de aerobacterias (más del 50%) se asocia a partículas con un diámetro aerodinámico >5 µm (fracción no respirable). En el interior de las viviendas se presenta un ligero incremento en la

concentración de aerobacterias asociadas a partículas de tamaño respirable (diámetro aerodinámico  $<5 \mu\text{m}$ ).

La distribución estacional de las BMC en los ambientes intra y extramuros, se expone en la figura 9. En el interior de las casas los niveles de aerobacterias no presentaron diferencia significativa entre la época de secas y de lluvias ( $Z= 0.9$ ), mientras que en el exterior las concentraciones fueron significativamente más altas ( $p<0.05$ ) durante el período de secas ( $Z= 2.9$ ). Con respecto a las muestras de polvo, el número de BMC fue significativamente más alto durante la época de lluvias, tanto en el interior ( $Z= 2.68$ ) como en el exterior ( $Z= 2.56$ ). Las concentraciones de BGN aisladas del aire y del polvo, no presentaron diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre las dos época muestreadas, en ninguno de los dos ambientes.

La temperatura del aire fluctuó entre 16 a 23°C en el interior de las casas y entre 14 a 25°C en el exterior; la humedad relativa registró valores muy similares en el interior (30 - 80%) y en el exterior (32 - 80%). En general, no se observó una clara relación entre los factores meteorológicos y las concentraciones de bacterias presentes en el aire y en el polvo. El coeficiente de correlación de Spearman únicamente mostró una correlación significativa entre la temperatura del aire y las concentraciones de BMC colectadas en extramuros, así como una correlación negativa significativa entre éstas y la humedad relativa (Tabla 10).

En relación con las características de las viviendas, el 50% de las casas tenían alfombra y el 70% mascotas. Estadísticamente, no se encontró una asociación significativa (prueba de Chi-cuadrada) entre los niveles de bacterias de intramuros y la presencia de alfombras o mascotas (datos no presentados); no obstante, los valores más altos de BGN del aire, así como los de coliformes totales y fecales aisladas del suelo, se encontraron en casas con la presencia de mascotas.

En la tabla 11 se presentan los serotipos de *E. coli* aislados de las muestras de aire y de polvo. La heterogeneidad más alta (70 serotipos) se obtuvo de las muestras de polvo colectadas en intramuros, mientras que en las muestras de aire sólo se obtuvieron 5 serotipos. Los serotipos más comúnmente aislados en el polvo de intramuros fueron O58:H30, O86:H10, O70:H11, O39:H11 y O91:H10. En el polvo de extramuros los más comunes fueron O87:H21, O8:H19 y O40:H30. De todos los serotipos aislados, sólo los siguientes se asocian con cepas enteropatógenas: O20:H-, O28:H-, O86:H34, O127:H9 y O142:H34.

El 14% del total de las cepas de *E. coli* presentaron resistencia a más de 2 antibióticos (Tabla 12), principalmente a la ampicilina, ticarcilina, piperacilina y tetraciclina. Todas las cepas con multirresistencia a los antibióticos se aislaron en intramuros, la mayoría procedentes del suelo, y sólo dos cepas del aire.

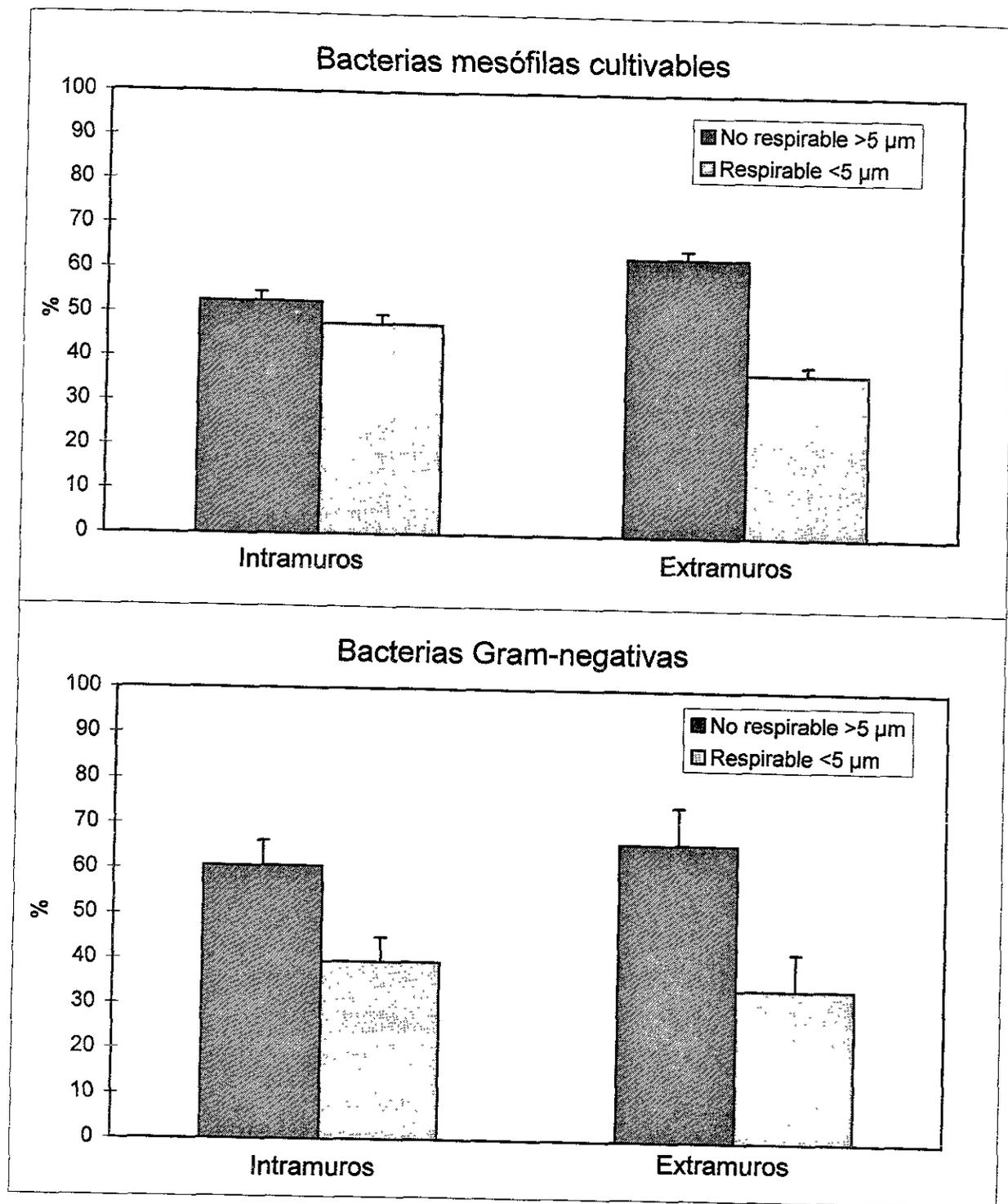
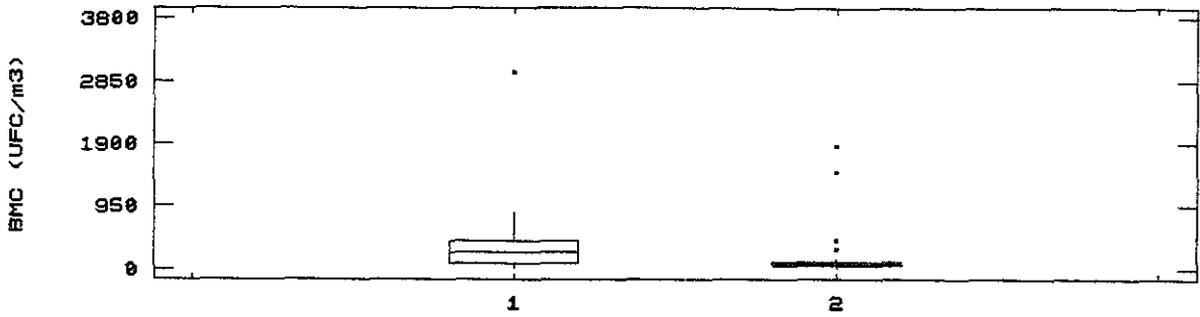
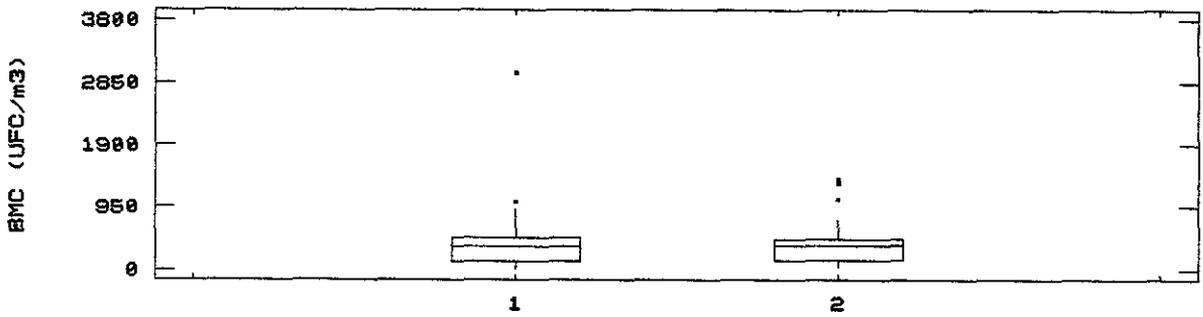


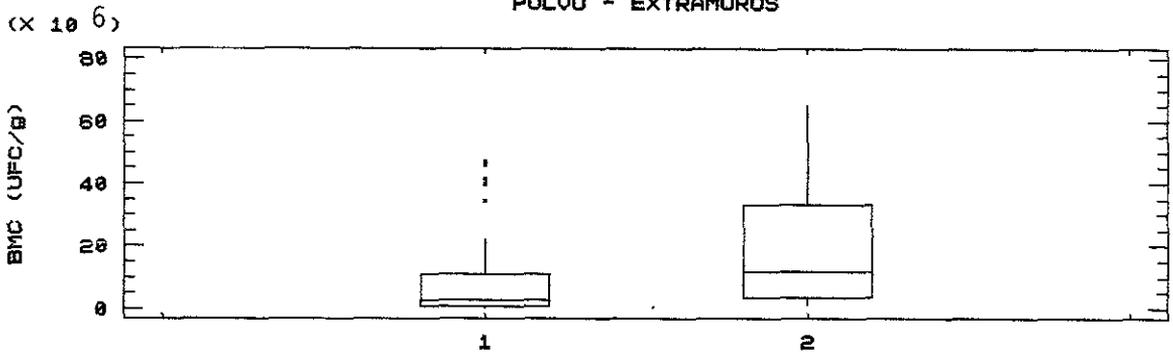
FIGURA 8. Distribución de las aerobacterias en las etapas del muestreador Andersen.



AIRE - INTRAMUROS



POLVO - EXTRAMUROS



POLVO - INTRAMUROS

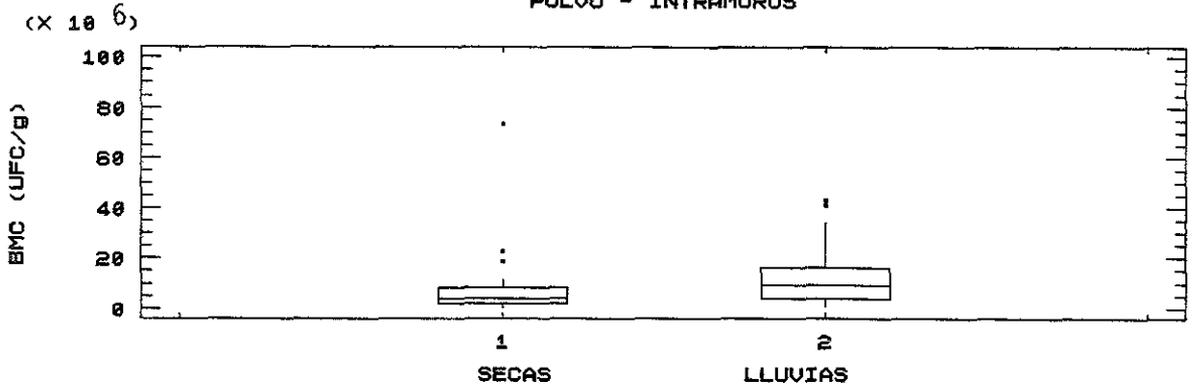


FIGURA 9. Distribución estacional de las bacterias mesófilas cultivables.

TABLA 10. Coeficiente de correlación de Spearman entre las concentración de bacterias y algunos factores meteorológicos.

| Bacterias             | Factores meteorológicos   |                      |
|-----------------------|---------------------------|----------------------|
|                       | Temperatura del aire (°C) | Humedad relativa (%) |
| INTRAMUROS            |                           |                      |
| AIRE                  |                           |                      |
| Mesófilas cultivables | 0.07                      | -0.12                |
| Gram-negativas        | -0.03                     | -0.02                |
| POLVO                 |                           |                      |
| Mesófilas cultivables | 0.22                      | 0.06                 |
| Gram-negativas        | 0.07                      | -0.13                |
| EXTRAMUROS            |                           |                      |
| AIRE                  |                           |                      |
| Mesófilas cultivables | 0.26*                     | 0.44*                |
| Gram-negativas        | -0.13                     | -0.06                |
| POLVO                 |                           |                      |
| Mesófilas cultivables | 0.21                      | 0.11                 |
| Gram-negativas        | 0.01                      | -0.15                |

\*  $p < 0.05$

TABLA 11. Serotipos de *Escherichia coli* aislados de las muestras de polvo y de aire.

| SEROTIPOS          |     |                     |     |                     |      |
|--------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|------|
| AIRE<br>INTRAMUROS |     | POLVO<br>EXTRAMUROS |     | POLVO<br>INTRAMUROS |      |
| O?:H1              | (1) | OR:H-               | (2) | O?:H-               | (7)  |
| O8:H1              | (1) | OR:H25              | (1) | O?:H7               | (2)  |
| O70:H11            | (1) | OR:H30              | (2) | O?:H9               | (2)  |
| O86:H34 *          | (1) | O7:H4               | (1) | O?:H10              | (1)  |
| O157:H49           | (1) | O7:H47              | (2) | O?:H40              | (1)  |
|                    |     | O8:H11              | (1) | OR:H-               | (3)  |
|                    |     | O8:H19              | (5) | OR:H14              | (2)  |
|                    |     | O8:H53              | (1) | OR:H21              | (1)  |
|                    |     | O15:H30             | (1) | OR:H30              | (2)  |
|                    |     | O18:H21             | (1) | O1:H30              | (2)  |
|                    |     | O25:H21             | (1) | O3:H11              | (1)  |
|                    |     | O25:H30             | (1) | O6:10               | (1)  |
|                    |     | O31:H28             | (1) | O6:H16              | (1)  |
|                    |     | O34:H40             | (2) | O7:H30              | (1)  |
|                    |     | O39:H21             | (1) | O8:H2               | (1)  |
|                    |     | O40:H30             | (5) | O8:H9               | (1)  |
|                    |     | O51:H2              | (4) | O8:H19              | (2)  |
|                    |     | O70:H11             | (3) | O8:H30              | (1)  |
|                    |     | O75:H10             | (2) | O8:H38              | (1)  |
|                    |     | O86:H21             | (1) | O8:H51              | (5)  |
|                    |     | O87:H21             | (6) | O8:H53              | (2)  |
|                    |     | O91:H10             | (1) | O11:H11             | (2)  |
|                    |     | O113:H4             | (1) | O14:H4              | (1)  |
|                    |     | O148:H40            | (1) | O15:H33             | (1)  |
|                    |     | O150:H40            | (1) | O18:H21             | (1)  |
|                    |     | O156:H5             | (1) | O19:H4              | (1)  |
|                    |     | O156:H7             | (1) | O20:H- *            | (1)  |
|                    |     | O166:H2             | (1) | O22:H49             | (1)  |
|                    |     | O166:H21            | (1) | O25:H1              | (1)  |
|                    |     |                     |     | O25:H30             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O26:H30             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O27:H-              | (1)  |
|                    |     |                     |     | O28:H- *            | (2)  |
|                    |     |                     |     | O34:H40             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O37:H-              | (1)  |
|                    |     |                     |     | O39:H11             | (11) |
|                    |     |                     |     | O39:H21             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O45:H28             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O48:H10             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O51:H2              | (3)  |
|                    |     |                     |     | O58:H30             | (18) |
|                    |     |                     |     | O59:H?              | (1)  |
|                    |     |                     |     | O59:H5              | (1)  |
|                    |     |                     |     | O66:H11             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O68:H9              | (1)  |
|                    |     |                     |     | O70:H11             | (13) |
|                    |     |                     |     | O79:H40             | (5)  |
|                    |     |                     |     | O86:H10             | (18) |
|                    |     |                     |     | O86:H21             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O86:H30             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O86:H 34 *          | (3)  |
|                    |     |                     |     | O86:H51             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O91:H-              | (2)  |
|                    |     |                     |     | O91:H10             | (10) |
|                    |     |                     |     | O103:H21            | (1)  |
|                    |     |                     |     | O109:H-             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O118:H1             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O127:H9 *           | (1)  |
|                    |     |                     |     | O132:H7             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O134:H10            | (1)  |
|                    |     |                     |     | O135:H9             | (2)  |
|                    |     |                     |     | O135:H40            | (2)  |
|                    |     |                     |     | O139:H45            | (1)  |
|                    |     |                     |     | O142:H34 *          | (3)  |
|                    |     |                     |     | O150:H40            | (2)  |
|                    |     |                     |     | O155:H4             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O157:H32            | (1)  |
|                    |     |                     |     | O159:H-             | (2)  |
|                    |     |                     |     | O159:H21            | (1)  |
|                    |     |                     |     | O165:H-             | (1)  |
|                    |     |                     |     | O166:H21            | (5)  |
|                    |     |                     |     | O170:H-             | (5)  |
| Heterogeneidad     | 5   |                     | 29  |                     | 70   |

( ): Abundancia

\* Serotipos asociados con *E. coli* enteropatógenas

TABLA 12. Cepas de *Escherichia coli* con multiresistencia antimicrobiana.

| Serotipo | ANTIBIÓTICOS |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|----------|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
|          | 1            | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |   |
| SUELO    |              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| OR:H30   | .            | R | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | . |
| O?:H-    | .            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | . |
| O?:H10   | R            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | . |
| O6:H16   | .            | R | . | . | . | . | . | . | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O7:H30   | R            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O8:H2    | .            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O8:H30   | .            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O11:H11  | .            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O20:H-   | .            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O25:H30  | R            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O26:H30  | R            | R | . | . | . | . | . | . | . | .  | .  | .  | .  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | . |
| O45:H28  | R            | R | R | . | . | . | . | . | . | .  | .  | .  | .  | .  | R  | .  | .  | .  | .  | R |
| O70:H11  | .            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O79:H40  | R            | R | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O103:H21 | R            | R | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O132:H7  | .            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O155:H4  | R            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O157:H32 | .            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O170:H-  | .            | . | . | . | . | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| AIRE     |              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| O70:H11  | .            | . | . | . | R | R | R | R | . | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |
| O157:H49 | R            | . | . | . | R | R | R | R | R | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | .  | R |

R= Resistente ; (-)= Susceptible

\* Antibióticos: 1 trimetoprim, 2 nitrofurantoína, 3 norfloxacina, 4 ciprofloxacina, 5 ampicilina, 6 ticarcilina, 7 piperacilina, 8 cefalocina, 9 cefazolina, 10 cefoxitina, 11 cefuroxina, 12 cefotaxina, 13 ceftaciclina, 14 amikacina, 15 gentamicina, 16 tobramicina, 17 cloramfenicol, 18 tetraciclina, 19 imipenem.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 AMBIENTE EXTRAMUROS

En la atmósfera de un ambiente extramuros es posible encontrar una gran cantidad de partículas biológicas, siendo las bacterias uno de los grupos más abundantes. En un ecosistema natural, la mayoría de las bacterias son saprobias y constituyen una parte importante de los organismos descomponedores de la materia orgánica y, por lo tanto, de los ciclos biogeoquímicos (Campbell, 1987). Sin embargo, en un ambiente urbano, existe una serie de factores que alteran las condiciones naturales del suelo, el agua y el aire, así como su composición biológica (Ezcurra y Mazari-Hiriart, 1996) .

En el presente estudio, las diferencias existentes entre las tres áreas estudiadas (norte, área urbano-industrial; centro, área urbano-comercial; y sur, área básicamente residencial) se reflejaron en las concentraciones y en el comportamiento aerobiológico de las bacterias colectadas durante el ciclo anual.

Otro factor que influyó en la estacionalidad presentada por las aerobacterias son las características meteorológicas que determinan el clima de la Ciudad de México. Los sistemas atmosféricos tropicales y templados que rigen en la ciudad, distinguen dos estaciones climáticas bien definidas: secas, de noviembre a abril, y lluvias, de mayo a octubre (Jáuregui y Luyando, 1992).

En las tres áreas de estudio, los niveles de aerobacterias fueron considerablemente superiores durante la época de secas, período en que se presentaron los valores máximos de bacterias Gram-negativas y coliformes, principalmente en el norte y centro del D.F. Durante los muestreos realizados en esta época del año, dominaron los vientos procedentes del este, noreste y sureste. Es de gran importancia considerar este factor meteorológico, ya que la velocidad y dirección del viento influyen directamente sobre la población microbiana suspendida en la atmósfera. La velocidad del viento proporciona la fuerza aerodinámica necesaria para aerosolizar las bacterias (como células independientes o asociadas a partículas) de diversas superficies, sobre todo si éstas se encuentran secas (Wright *et al.*, 1969).

Durante la época de secas, principalmente en la segunda mitad de esta estación (febrero a abril), la Ciudad de México se ve afectada por tormentas de polvo originadas por la erosión eólica de los suelos del sector noreste y este de la ciudad, donde se encuentran los antiguos lagos de Texcoco y de Chalco. En estas áreas, la precipitación anual es menor de 600 mm y la vegetación es escasa, por lo que las

concentraciones de polvo son comúnmente mayores a la norma ( $260 \mu\text{g}/\text{m}^3$  por 24 h) propuesta internacionalmente por la Organización Mundial de la Salud (Jáuregui, 1989; 1995). El polvo de este sector de la ciudad en su mayoría es de origen natural, por lo que el contenido de microorganismos puede ser alto; además, esta región se caracteriza también por su alta densidad de viviendas de bajo costo, con instalaciones sanitarias precarias, por lo que no es extraño que se presente fecalismo al aire libre, así como contaminación del suelo por drenajes abiertos.

Por lo tanto, es posible que el mayor contenido de aerobacterias coliformes en el norte y centro de la ciudad, esté asociado en gran parte a las partículas que son acarreadas por el viento de la zona este del D.F. Hacia el sur de la ciudad, las concentraciones de polvo decrecen por depositación, a medida que avanza la nube polvosa, así como por la captura de las partículas por la vegetación, la cual es más abundante en esta región (Jáuregui, 1989). Este comportamiento de las partículas suspendidas en la atmósfera, coincide con la baja concentración de bacterias coliformes recuperadas en esta área de estudio.

Durante el período de lluvias, en el norte y sur de la ciudad, dominaron los vientos procedentes del norte. En el sector norte de la ciudad, existen zonas densamente industrializadas, sobre todo en el área Vallejo-Tlalnepantla-Naucalpan, por lo que las partículas que se generan son en gran parte contaminantes químicos (como  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{CO}$ , y  $\text{CO}_2$ , entre otros) y es posible que el contenido de partículas biológicas sea bajo. En el centro de la ciudad dominaron los vientos del suroeste, sin embargo, es difícil explicar la influencia del viento en esta zona, ya que su patrón es variable. En el centro del D.F., además de la interacción de los vientos regionales (o de macroescala), así como de los vientos locales inducidos por la topografía, se sobrepone una circulación centrípeta de intensidad variable, que se genera por la llamada "isla de calor" (Jáuregui y Luyando, 1992).

En la estación lluviosa del año, las concentraciones de aerobacterias fueron más bajas que en la época de secas. Esta disminución se debe, en gran parte, al fenómeno del "lavado atmosférico", es decir que la lluvia limpia temporalmente la atmósfera de partículas suspendidas, incluyendo las de origen biológico. Por otra parte, durante la época de lluvias la humedad del suelo retarda la aerosolización de las partículas, a pesar de que ésta favorece el crecimiento de los microorganismos a nivel del suelo (Wright *et al.*, 1969). La variación estacional de las aerobacterias, así como el efecto de la lluvia sobre el contenido de bacterias en la atmósfera, ha sido reportado en otros trabajos (Kelly y Pady, 1954; Bovallius *et al.*, 1978; Jones y Cookson, 1983; Rosas *et al.*, 1994 a), con patrones de comportamiento muy similares a los observados en el presente estudio.

En relación a los parámetros de temperatura y humedad relativa, no fue posible observar consistentemente la influencia de los mismos sobre las aerobacterias. Se han realizado diversas investigaciones dirigidas a tratar de establecer los factores que afectan la sobrevivencia de las bacterias en la atmósfera; con frecuencia se menciona que la humedad, la temperatura y la radiación solar, así como diversos contaminantes químicos, son los principales factores que influyen en la viabilidad de las aerobacterias (Benbough, 1967; Dimmick y Akers, 1969; Lighthart, 1973). La mayoría de estos estudios se han realizado con generadores de aerosoles, bajo condiciones controladas de laboratorio y generalmente analizando cada parámetro en forma individual. En cambio, bajo las condiciones naturales de una atmósfera urbana, es mucho más complejo encontrar una relación entre estos parámetros y los microorganismos, ya que los diversos factores ambientales pueden tener un efecto sinérgico sobre la permanencia de las bacterias en la atmósfera.

A lo largo del período anual de estudio, en las tres zonas de muestreo se observó una amplia variación en las concentraciones de aerobacterias mesófilas cultivables, con valores entre  $10^2$  y  $10^3$  UFC/m<sup>3</sup>. Este patrón de comportamiento parece ser característico de las áreas urbanas densamente pobladas (Bovallius *et al.*, 1978), donde el tráfico vehicular provoca flujos de aire turbulentos que resuspenden las partículas del suelo, siendo probablemente, a nivel local, más importantes que el viento en la dispersión de bacterias y partículas a la atmósfera. Asimismo, la presencia de un gran número de personas, libera bacterias que están distribuidas en la piel y el tracto respiratorio, y que son aerosolizadas a través del movimiento, o de la acción de toser y estornudar (Yongyi, *et al.*, 1993).

Estas condiciones fueron más evidentes en las zonas norte y centro de la ciudad, donde más del 60% de la superficie terrestre se encuentra construida, las áreas verdes están restringidas a parques y camellones, y el tráfico vehicular es intenso. Las concentraciones de aerobacterias cultivables, obtenidas en ambas zonas, no presentaron diferencia significativa (mediana de 816 y 874 UFC/m<sup>3</sup>, en el norte y centro, respectivamente), debido posiblemente a la similitud que muestran estas áreas, en relación a las condiciones de urbanización y contaminación del suelo.

Por otra parte, la norma de calidad del aire (Ciseros, 1991) para partículas suspendidas totales (PST) y partículas menores de 10  $\mu$ m (PM<sub>10</sub>), se sobrepasó en ambas zonas durante varios de los días de muestreo. Las concentraciones de aerobacterias cultivables correlacionaron positivamente con las PM<sub>10</sub>, lo que implica que pueden ser inhaladas y retenidas en la región alveolar del tracto respiratorio (Cicero y Cano, 1992), existiendo el riesgo potencial de provocar infecciones respiratorias y/o de inducir reacciones de hipersensibilidad, dependiendo de la composición (especies) de las bacterias. Mancinelli y Shulls (1978), así como Bovallius y colaboradores (1978), también encontraron una correlación significativa entre el

número total de bacterias cultivables y la concentración del material particulado suspendido en la atmósfera, asumiendo que las bacterias en el aire son generadas en mayor concentración, bajo condiciones de sequedad en el ambiente.

En el área sur, se obtuvieron concentraciones de aerobacterias cultivables significativamente menores, en comparación con las registradas en el norte y centro del D.F. La zona estudiada en esta parte de la ciudad se caracterizó por presentar un tráfico vehicular y peatonal moderado, lo que se reflejó en la baja concentración de bacterias presentes en la atmósfera. Además, como ya se mencionó anteriormente, en este sector de la ciudad la contaminación por partículas suspendidas es menos severa, y por lo tanto, el contenido de aerobacterias también es menor.

En general, los niveles de bacterias mesófilas cultivables, obtenidas en este estudio, son similares a las reportadas en otros países (Bovallius *et al.*, 1978; Mancinelli y Shulls, 1978; Jones y Cookson, 1983), donde el número de aerobacterias aisladas de zonas urbanas y suburbanas fluctúan entre 35 a 4000 UFC/m<sup>3</sup>, no excediendo en promedio las 300 bacterias por m<sup>3</sup>.

Más del 50% de las aerobacterias cultivables se impactaron en la fracción no-respirable del muestreador Andersen, lo que indica que las bacterias se asocian en su mayoría a partículas con un diámetro aerodinámico >5 µm. Esto sugiere que gran parte de las partículas recuperadas en las áreas estudiadas fueron de origen local, ya que la velocidad de sedimentación para una partícula de 8 µm se estima en 0.20 cm/seg. y para una partícula de 3.3 µm en 0.002 cm/seg. (Dimmick y Akers, 1969).

En relación a la composición de las aerobacterias, en esta investigación, al igual que lo reportado en otros trabajos (Mancinelli y Shulls, 1978; Yongyi *et al.*, 1993), los cocos y bacilos Gram-positivos constituyeron más del 90% de las aerobacterias mesófilas cultivables, mientras que las Gram-negativas representaron sólo una pequeña fracción del total de aerobacterias. Diversas especies de cocos y bacilos Gram-positivos integran una parte importante de la microbiota natural del suelo, así como de la piel de animales y humanos. Por lo anterior, y dado que las muestras en este estudio, fueron tomadas en áreas con alta densidad poblacional, es normal que se encuentre este tipo de bacterias en el aire. Además, algunas de estas bacterias presentan pigmentos carotenoides (como *Micrococcus* y *Staphylococcus*), lo cual les permite sobrevivir a la exposición de la radiación solar mejor que los microorganismos no pigmentados. Otras bacterias como *Bacillus* (distribuidas ampliamente en el suelo) tienen la capacidad de producir esporas, por lo que esta resistencia es responsable de su abundancia en la atmósfera.

A pesar de que algunas especies de bacterias Gram-negativas son comunes en las hojas de los árboles y el suelo (Preece y Dickinson, 1971), son colectadas en bajas

concentraciones de la atmósfera, debido probablemente a que este tipo de bacterias (por la constitución de su pared celular) son más susceptibles al estrés provocado por la deshidratación, la radiación solar y los contaminantes químicos (Cox, 1987; Ehrlich y Miller, 1973; Lighthart, 1973; Fedorak y Westlake, 1978). La proporción más alta de bacterias Gram-negativas determinadas en este estudio, lo constituyeron bacilos no-fermentadores, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*. En general, los microorganismos de este grupo son abundantes en el suelo y el agua, aunque existen algunas especies parásitas de plantas y animales, así como patógenos oportunistas del hombre (Murray *et al.*, 1984).

Es importante resaltar que en los estudios de ambientes extramuros realizados en otros países, se han reportado altas concentraciones de aerobacterias coliformes únicamente en zonas cercanas a una fuente puntual de contaminación biológica, como son las plantas de tratamiento de aguas residuales y los centros de manejo de desechos sólidos (Hickey y Reist, 1975; Crook *et al.*, 1987). Sin embargo, en México el suelo es continuamente contaminado con material fecal proveniente de animales y del hombre (sobre todo en algunas áreas densamente pobladas), el cual puede ser fácilmente introducido a la atmósfera, al igual que los microorganismos contenidos en el mismo, por la acción del viento sobre la superficie y por sus fluctuaciones de turbulencia.

En esta investigación se aislaron bacterias coliformes en un 40-60% de los muestreos, obteniéndose los valores máximos en el norte y centro de la ciudad (alrededor de 70 UFC/m<sup>3</sup>). *Escherichia coli* se logró aislar, aunque en bajas concentraciones, sobre todo durante la época de secas, que es cuando la Ciudad de México enfrenta el problema de las tormentas de polvo procedente del oriente de la ciudad. En un estudio similar realizado por Rosas y colaboradores (1994 a), se aisló *Escherichia coli* del aire, constituyendo aproximadamente el 15% del total de las bacterias Gram-negativas determinadas. Los resultados de ambas investigaciones demuestran la presencia de material de origen fecal suspendido en la atmósfera, al igual que la capacidad de sobrevivencia de algunas cepas de *E. coli*, a pesar de los múltiples factores adversos que intervienen en su viabilidad.

La baja incidencia y concentración de bacterias coliformes recuperadas en el presente estudio, sugiere que la mayoría de las bacterias Gram-negativas se estresan durante la aerosolización, y pueden estar en la atmósfera en un estado viable-no cultivable (Colwell *et al.*, 1985), o mueren, principalmente a causa de la deshidratación (Czonka, 1989; Walter *et al.*, 1990).

A pesar de las limitaciones que presenta el trabajo realizado en esta parte de la tesis, los resultados obtenidos pueden ser de interés para la salud pública. En la Ciudad de México existen más de 6 millones de casos de diarrea registrados anualmente, sobre

todo en niños menores de 5 años, y se observa un patrón estacional, ya que la incidencia de diarrea es mayor durante la estación seca y caliente del año, y disminuye durante la estación lluviosa (Dirección General de Epidemiología, SSA, 1991). Estos datos coinciden con los resultados de bacterias coliformes presentados en esta investigación, lo que indica que puede existir un riesgo potencial hacia la población, por la diseminación aérea de bacterias patógenas contenidas en la materia de origen fecal que contamina el suelo.

Por otra parte, en un estudio realizado en el Hospital Infantil de México en pacientes pediátricos, se encontró que en los casos de diarrea los agentes patógenos más frecuentes fueron *E. coli* enterotoxigénica (17% de los casos), Rotavirus (13%), *Campylobacter* (15%), *Shigella* (11%), *E. coli* enteropatógena (10%), y *Salmonella* (4%), entre otros (Hullan *et al.*, 1991). Asimismo, se ha reportado que *E. coli* enterotoxigénica es el agente etiológico de la llamada "diarrea del viajero", en más del 50% de los casos, seguido por Rotavirus, *Shigella*, *Salmonella* y *Vibrio* (Anonym, 1986; Taylor y Echeverría, 1986).

## 7.2 AMBIENTE INTRAMUROS

Con base en los resultados obtenidos en la primera parte de la presente investigación (ambiente extramuros), se planteó la necesidad de continuar con una segunda etapa, en la que se caracterizara la calidad microbiológica del interior de un ambiente doméstico, siendo de gran importancia para la salud humana, ya que en este tipo de ambiente pasamos la mayor parte de nuestro tiempo. Con este objetivo, se eligió el sur del Distrito Federal (Delegación Tlalpan) como área de estudio, por ser una zona principalmente residencial y por la facilidad de realizar los muestreos en un sitio cercano a nuestro lugar de trabajo (Ciudad Universitaria). Dado que el suelo es la fuente principal de bacterias a la atmósfera, se decidió analizar también muestras de polvo provenientes tanto del interior como del exterior de las casas. Todas las viviendas estudiadas presentaron ventilación natural, a través de puertas y ventanas. Por otra parte, debido a la baja recuperación de aerobacterias coliformes en extramuros, se probó el uso de la glicinabetaína como agente osmoprotector.

Teóricamente, en una construcción normal no deben existir las condiciones que propicien la acumulación y multiplicación de los microorganismos, de tal manera que la concentración presente en intramuros esté balanceada por la ventilación natural que exista en las casas (Rylander, 1994). La ausencia de ventilación puede causar su acumulación en el interior y aunado a otros problemas, como son el incremento de la humedad o la presencia de plantas y mascotas, propiciar el deterioro de la calidad microbiológica en intramuros. Bajo estas condiciones, la circulación del aire puede

resuspender el polvo de las superficies y aerosolizar microorganismos, que normalmente no se encuentran en la atmósfera.

Existe poca información disponible en relación al tipo y concentración de bacterias presentes en un ambiente doméstico. Los niveles de aerobacterias mesófilas cultivables obtenidos en este estudio (Med= 363 UFC/m<sup>3</sup>), son comparables a las reportadas previamente por otros investigadores. Reponen y colaboradores (1989) obtuvieron una mediana de 330 UFC/m<sup>3</sup> durante un período de dos años de estudio en tres casas de Finlandia; Godish y colaboradores (1993), reportaron una media geométrica de 585 UFC/m<sup>3</sup>, como resultado del muestreo de 40 casas en Australia; Hunter y colaboradores (1995), colectaron muestras de 163 casas en el Reino Unido y obtuvieron una media de 366 UFC/m<sup>3</sup> de aire.

La diferencia en los resultados depende de varios factores, entre los que se encuentran las condiciones de las viviendas, situación geográfica, método de muestreo, así como los períodos de actividad o inactividad durante la toma de muestras. Es bien sabido que los niveles de aeropartículas viables varían durante el día (Miller, 1992) y que se incrementan como resultado de la actividad o decrecen cuando la casa no está ocupada (Hunter *et al.*, 1988; Macher *et al.*, 1991). En este estudio, los muestreos se realizaron durante períodos de inactividad, incluso sin la presencia de la mayoría de los habitantes de las casas, por lo que es muy probable que las concentraciones de aerobacterias se incrementen durante los períodos de actividad en las viviendas.

Por otra parte, en la presente investigación se compararon los niveles de bacterias suspendidas en la atmósfera de intramuros, con los niveles del exterior. En las regiones tropicales, como la Ciudad de México, la interacción entre los ambientes intra y extramuros es continuamente regulada por los gradientes de temperatura, debido a la ventilación pasiva de las casas. En general, se asume que las concentraciones de aeropartículas viables en intramuros deben ser menores que las del exterior, excepto posiblemente para las bacterias comensales del hombre (Muilenberg, 1995). La penetración de aerosoles microbianos al interior de las casas depende del tipo de ventilación de las mismas. En las construcciones con ventilación natural (es decir donde las puertas y ventanas están abiertas y permiten la entrada del aire del exterior), la tasa intramuros/extramuros (I/E) para un determinado tipo de aeropartículas suele ser mayor que en los edificios donde la ventilación está controlada (Burge, 1995). Cuando existe una fuente de contaminación biológica en intramuros, la relación I/E es mayor a la unidad (I/E >1).

Los resultados en esta investigación mostraron que las concentraciones de aerobacterias cultivables registradas en el interior y el exterior de las casas fueron similares (estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre éstas), lo que

puede ser reflejo de la ventilación natural de las casas. A pesar de ello, los niveles de aerobacterias cultivables en intramuros fueron mayores que en el exterior (tasa I/E > 1 en el 70-80% de los muestreos), sobre todo en el caso de las bacterias Gram-negativas. Resultados similares fueron obtenidos por Reponen y colaboradores (1990), durante el muestreo de diversas casas urbanas y suburbanas en Finlandia, donde se obtuvo una tasa I/E >1 en el 90% de los muestreos. Sin embargo, es importante mencionar que estos resultados incluyen la estación invernal, cuando el exterior se encuentra cubierto de nieve en esta zona, por lo que es normal que la concentración de aerobacterias en intramuros supere a la del exterior. En nuestro caso en particular, el hecho de haberse presentado una mayor concentración de aerobacterias en intramuros, nos puede indicar la presencia de fuentes generadoras de bacterias en este ambiente que deben ser localizadas para su control.

Al igual que lo reportado por otros investigadores (Flannigan *et al.*, 1991), una alta proporción de las bacterias fueron colectadas en partículas con un diámetro aerodinámico mayor a 5µm (etapa 1 del muestreador Andersen), lo que sugiere que las células bacterianas se dispersan con mayor frecuencia asociadas a partículas que individualmente.

En el polvo depositado, se obtuvieron concentraciones de bacterias mesófilas cultivables y de bacterias Gram-negativas relativamente altas (del orden de  $10^3$  y  $10^6$  UFC/g de polvo). Los valores más altos de bacterias se obtuvieron en casas con alfombras ( $70 \times 10^6$  UFC/g), las cuales actúan al mismo tiempo como fuentes de generación y como colectores de diversos materiales orgánicos e inorgánicos potencialmente contaminantes, entre los que se encuentran los microorganismos y/o partes estructurales de los mismos, como las endotoxinas de las bacterias Gram-negativas (Ragsdale *et al.*, 1995).

En general, las bacterias aisladas en intramuros, al igual que en extramuros, están dominadas por cocos y bacilos Gram-positivos (Godish *et al.*, 1993; Maroni *et al.*, 1993), entre los que se encuentran *Staphylococcus*, considerados como parte de la microbiota normal de la piel de los individuos (Haberberg *et al.*, 1991; Macher *et al.*, 1991). En otros estudios se han logrado colectar bacilos Gram-negativos en bajas concentraciones (2-5% del total de colonias determinadas), pero entre estas bacterias no se ha detectado la presencia de bacterias coliformes (Maroni *et al.*, 1993). En contraste, en la presente investigación *Escherichia coli* fue aislada entre las bacterias Gram-negativas, siendo un punto de interés ya que esta bacteria sólo ha sido reportada en ambientes donde la fuente de contaminación puede ser materia fecal de animales o humanos (Boutin *et al.* 1987 ; Crook *et al.*, 1987; Rosas *et al.*, 1996).

La baja frecuencia de aislamiento de *E. coli* de la atmósfera, puede estar asociada a las condiciones de inactividad que prevalecieron en las casas durante los muestreos, o

a la presencia de cepas viables no-cultivables. Es importante mencionar que, aunque estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de aerobacterias obtenidas en los medios con y sin glicinabetaína, el aislamiento de *E. coli* en el aire sólo se logró con el uso de este compuesto como osmoprotector (Ghoul *et al.*, 1990; Marthi y Lighthart, 1990). Esto sugiere que *E. coli* puede ser dañada durante el proceso de aerosolización (Cox, 1987, 1989; Marthi *et al.*, 1991) y que la adición de glicinabetaína al medio de colecta favorece su recuperación. Es posible que incrementando el tamaño de la muestra se aprecie una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de bacterias colectadas con y sin el osmoprotector.

Diversos estudios realizados con bacterias han demostrado el efecto osmoprotector de la glicinabetaína y otros compuestos similares, como la prolina, taurina y trealosa. Estas moléculas de bajo peso molecular son acumuladas dentro de la célula, regulando el balance osmótico del citoplasma con el ambiente, lo que reduce el daño causado por la deshidratación, al mismo tiempo que se estabiliza la actividad enzimática de la célula (Yancey *et al.*, 1982; Marthi y Lighthart, 1990). Así, por ejemplo, se ha reportado que un incremento en la sobrevivencia de *E. coli* en el agua de mar, está acompañado por la síntesis de glicinabetaína (Munro *et al.*, 1989). También se ha observado que el estrés osmótico en *E. coli* produce una pérdida en su capacidad para formar colonias, la cual se recupera con la adición de glicinabetaína (Roth *et al.*, 1988).

En el polvo depositado en el interior de las viviendas, la frecuencia de aislamiento de *E. coli* fue superior al 33%, lo que indica que esta bacteria puede estar protegida en un ambiente intramuros, debido, entre otros factores, a que no está expuesta a las radiaciones solares. Asimismo, es posible que los niveles de temperatura y humedad que predominan en las alfombras (lugar de donde preferentemente se tomaron las muestras de polvo) favorezcan la permanencia de estas bacterias en el ambiente. Cabe señalar que durante la época de lluvias se obtuvo un incremento significativo en las concentraciones de bacterias contenidas en el polvo, lo que puede atribuirse al mayor contenido de humedad dentro de las viviendas, y por lo tanto de las alfombradas, sobre todo en áreas poco ventiladas.

Se ha propuesto que una alta concentración de bacterias Gram-negativas, oxidasa negativas y fermentadoras de glucosa, en un ambiente intramuros, indica la existencia de una fuga en el sistema de drenaje o bien una posible comunicación entre la ventilación del sanitario y el resto de la vivienda, de manera que el aire del sanitario, que puede estar cargado con este tipo de bacterias, actúe como fuente de contaminación dentro de las casas (Macher *et al.*, 1995). En México, además de este problema, se presenta el fecalismo al aire libre (tanto de animales domésticos como del hombre), así como la convivencia con mascotas en el interior de las viviendas, por

lo que las bacterias coliformes aisladas en este estudio pueden provenir tanto de fuentes internas como externas.

La mayoría de los serotipos de *E. coli* determinados en esta investigación, pertenecen a la microbiota nativa del intestino humano. A pesar de ello, se lograron aislar cinco cepas que han sido reportadas como enteropatógenas: O20:H-, O28:H-, O86:H34, O127:H9 y O142:H34 (Law, 1994), las cuales se recuperaron del polvo depositado en intramuros. Esto constituye un riesgo potencial hacia los habitantes de las viviendas, sobre todo para los niños que son los afectados con mayor frecuencia. Otros serotipos identificados, que pueden pertenecer a *E. coli* patógenas, son: O8, O25, O20 del grupo ETEC; O26 EPEC, y O157 del grupo EHEC ; sin embargo, esto debe ser confirmado por pruebas de DNA. El hallazgo del serogrupo O157 puede ser de gran importancia, debido a que el grupo de *E. coli* enterohemorrágica incluye como prototipo la O157:H7, relacionada con diferentes casos de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Muñoz *et al.*, 1996; Schoeni y Doyle, 1994).

La presencia de estas bacterias en el ambiente puede estar asociada a características genéticas que les permiten mantenerse viables por más tiempo en ambientes estrés. Se ha reportado que algunas bacterias muestran una asociación entre resistencia a antibióticos y a diversos factores ambientales (Fernández-Astorga *et al.*, 1992; Jobling *et al.*, 1988). En el presente estudio, 14% de las cepas de *E. coli* mostraron multiresistencia a antimicrobianos, principalmente a la ampicilina, ticarcilina, piperacilina y tetraciclina, siendo factible que se deba al gran consumo de estos antibióticos en el control empírico de las enfermedades diarreicas (Shoemaker *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1992).

Por último, es importante mencionar que *E. coli* siempre debe ser considerada como un agente causal potencial, aún cuando la caracterización detallada de los factores de virulencia no permitan clasificar fácilmente una cepa sospechosa. La plasticidad genética de las bacterias puede favorecer que surja, bajo ciertas circunstancias, otra combinación de factores de virulencia, diferente a las que se conocen en la actualidad (Hedberg *et al.*, 1997). Recientemente se describió un brote de enfermedad gastrointestinal, con características clínicas y epidemiológicas propias de *E. coli* enterotoxigénica. Sin embargo, el agente causal fue una cepa no móvil de *E. coli* (*E. coli* O39 :NM), negativa a las toxinas termolábil (LT) y termoestable (St<sub>a</sub>, ST<sub>b</sub>) que caracterizan al grupo ETEC, pero con otros factores de virulencia, inusuales, en funcionamiento (Hedberg *et al.*, 1997). En los últimos 50 años, se ha descubierto una amplia variedad de factores de virulencia en *E. coli*, lo que ha permitido su clasificación en diversas categorías. No obstante, es claro que existen cepas de *E. coli* asociadas con enfermedades diarreicas, que no han sido reconocidas como enteropatógenas.

## 8. CONCLUSIONES

La contaminación del ambiente por material de origen fecal es un problema que aún persiste en nuestro país, teniendo repercusiones en la salud de la población. Se ha comprobado que *Escherichia coli* enteropatógena es uno de los microorganismos aislados con mayor frecuencia de heces de niños con diarrea, así como de viajeros que desarrollan diarrea aguda. Por lo anterior, se han hecho esfuerzos para detectar cepas de *E. coli* de muestras ambientales de diferentes orígenes. Algunos serotipos que se han determinado pertenecen a la microbiota indígena del intestino humano ; sin embargo, otros serotipos están consistentemente asociados con mecanismos de virulencia que hacen a estas bacterias, enteropatógenas para los humanos.

En el presente estudio, se realizó una evaluación cuantitativa y cualitativa de las bacterias entéricas aisladas de diversos ambientes intra y extramuros de la Ciudad de México, llegando a las siguientes conclusiones :

1. Las concentraciones de bacterias entéricas en el aire presentan una distribución estacional, dependiente tanto de las fuentes locales de generación como de los factores meteorológicos prevalecientes.
2. Los niveles más altos de aerobacterias registrados en extramuros se obtuvieron durante la época de secas. En este período, los vientos dominantes en la ciudad provinieron del este, lugar donde se encontraban los lagos de Chalco y Texcoco, por lo que al paso del viento sobre el suelo seco y desforestado se forman grandes cortinas de polvo cargadas de microorganismos que se esparcen por la ciudad.
3. *Escherichia coli* se logró aislar del aire principalmente durante la época de secas, correspondiendo al pico estacional anual de infecciones gastrointestinales en el Distrito Federal.
4. La presencia de bacterias Gram-negativas (BGN) y coliformes totales (BCT) en el aire, correlacionaron positivamente ( $p < 0.05$ ) con las concentraciones de partículas suspendidas totales (PST) y partículas menores de  $10 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ).
5. Las zonas norte y centro de la ciudad presentaron las concentraciones más altas de aerobacterias, debido posiblemente a la turbulencia generada por el intenso tráfico vehicular imperante en estas áreas, así como por la presencia de una gran número de peatones (sobre todo en el área centro), los cuales actúan por sí mismos como fuentes de dispersión de bacterias.
6. En relación a los resultados obtenidos en intramuros, al igual que en el exterior, las concentraciones de aerobacterias fueron mayores durante la época de secas ; sin embargo, el número de bacterias presentes en el polvo depositado fue mayor en el período de lluvias, lo cual indica que las bacterias se ven favorecidas por el incremento de la humedad del suelo.

7. La tasa intramuros/extramuros (I/E) para las concentraciones de BGN fue mayor a uno en más del 50% de las muestras, procedentes tanto del aire como del polvo, existiendo la posibilidad de que en el ambiente intramuros haya fuentes generadoras de bacterias, o bien que exista deficiencia en la ventilación de las viviendas.
8. A pesar de que estadísticamente no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), entre las concentraciones de aerobacterias colectadas en los medios de cultivo con y sin glicinabetaína, la incorporación del osmoprotector favoreció la recuperación de las aerobacterias Gram-negativas, incluyendo de *E. coli*, por lo que es posible que la mayoría de las aerobacterias Gram-negativas se dañen durante la aerosolización, pudiendo estar no viables o en un estado viable no cultivable.
9. Es necesario reforzar el estudio comparativo entre los medios de cultivo con y sin glicinabetaína, a fin de lograr estadísticamente mejores resultados que comprueben el efecto osmoprotector que tiene este compuesto sobre las aerobacterias Gram-negativas.
10. En las muestras de polvo, *E. coli* se aisló con mayor frecuencia en el interior de las viviendas que en el exterior, con mejores resultados usando la técnica de tubos múltiples de fermentación (TMF) que con la inoculación en placa. La baja recuperación de *E. coli* de las muestras sembradas en placas de agar, sugiere que otras bacterias presentes en la muestra inhiben el desarrollo de las colonias de *E. coli*. En cambio, con la técnica de TMF, el enriquecimiento previo con caldo lactosado favorece la recuperación de las bacterias coliformes, antes de ser sometidas a los medios selectivos y a la temperatura de 45°C.
11. En los diversos ambientes estudiados durante esta investigación, la mayoría de las aerobacterias se asociaron a partículas con un diámetro aerodinámico  $> 5\mu\text{m}$ , lo que indica que estas partículas se pueden impactar en la región nasofaríngea, pero difícilmente llegan a la región alveolar del tracto respiratorio.
12. La heterogeneidad más alta de *E. coli* (70 serotipos) se obtuvo de las muestras de polvo colectadas en intramuros, de los cuales cinco serotipos se asociaron con cepas enteropatógenas (O20 :H-, O28 :H-, O86 :H34, O127 :H9 y O142 :H34), lo que representa un riesgo potencial hacia los habitantes de las viviendas.
13. El 14% de las cepas de *E. coli* presentaron resistencia a más de dos antibióticos, principalmente a aquéllos utilizados con mayor frecuencia en el tratamiento de enfermedades diarreicas, como son la ampicilina, ticarcilina, piperacilina y tetraciclina.
14. Se requiere concientizar a la población sobre la necesidad de implementar medidas sanitarias, tanto en el interior como en el exterior de las casas, evitando el fecalismo al aire libre (de animales y del hombre), manteniendo limpias las alfombras y evitando la presencia de mascotas en el interior de las viviendas, entre otras.

15. Por último, con base en los resultados y en la experiencia adquirida durante este estudio, considero que en la actualidad no basta con evaluar el contenido de bacterias coliformes o de *E. coli* como bacterias indicadoras de contaminación fecal en el ambiente, y por lo tanto de riesgo hacia la población. Es necesario profundizar en el estudio de estas bacterias, realizando de ser posible, además de análisis serológicos y antimicrobianos (como en este trabajo), estudios moleculares (como la presencia de plásmidos), y de patogenicidad (a nivel de ADN), con lo que se puede tener una idea más clara del verdadero riesgo que representan estas bacterias hacia la población.

## 9. REFERENCIAS

- Adams, A.P., M. Garbett, H.B. Ress, y B.G. Lewis. 1980. Bacterial aerosols produced from a cooling tower using wastewater effluent as makeup water. *J. Water Pollut. Control Assoc.* **52**(3): 498-501.
- Ager, B.P., y J.A. Tichner. 1983. The control of microbiological hazards associated with air conditioning and ventilation systems. *Annual Occupational Hygiene.* **27**(4): 341-358.
- American Public Health Association. 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16<sup>a</sup> Ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Andersen Sampler Inc. 1984. Operating manual for Andersen Sampler. Atlanta.
- Anonym, E. 1986. Concensus development conference statement on traveler's diarrhoea. *Rev. Inf. Dis.* **8** :227.
- Benbough, J.E. 1967. Death mechanisms in airborne *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **47**:325-333.
- Benbough, J.E. 1969. Factors affecting the toxicity of oxygen towards airborne coliforms bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **56**:241-250.
- Bernstein, M.E., H.M. Howard, y G.C.Carrol. 1973. Fluorescence microscopy of Douglas for foliage epiflora. *Can. J. Microbiol.* **19**:1129-1130.
- Boutin, P., M. Torre, J. Moline, y E. Boissinot. 1987. Bacterial atmospheric contamination in wastewater treatment plants, p. 365-370. *En G. Boehm y R.M. Leuschner* (ed), *Advances in Aerobiology*. Birkhauser Verlag Basel. Estocolmo.
- Bovallius, A., B. Bucht, R. Roffey, y P. Anäs. 1978. Three year investigation of the natural airborne bacterial flora of four locaties in Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 847.
- Bovallius, A., R. Roffey, y E. Henningsons. 1980. Long-range transmission of bacteria. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **353**:186-200.
- Brooks, B.O., y W.F.Davis. 1992. Understanding indoor air quality. CRC Press, Inc. Boca Raton , Florida.
- Brown, A.D., y J.R. Simpson. 1972. Water relation of sugar-tolerant yeast: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **72**:589-591.
- Burge, H.A., W.R. Solomon, y J.R. Boise. 1980. Microbial prevalence in domestic humidifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**(4):840-844.
- Burge, H.A. 1985. Indoor sources for airborne microbes, p. 139-148. *En Indoor air and human health*. R. Gammage y R. Kaye (ed). Lewis Publishers, Chelsea, Boca Raton, Florida.
- Burge, H.A. 1995. Bioaerosols. Lewis Publishers, Chelsea, Boca Raton, Florida.

- Bustamante, V.H., J.L. Puente, F. Sánchez-López, M. Bobadilla, y E. Calva.** 1995. Identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using the *rpoB* gene and a cryptic DNA fragment from *C. jejuni*. *Gene*. **165**:1-8.
- Butterworth, J., y H.A. McCartney.** 1991. The dispersal of bacteria from leaf surfaces by water splash. *J. Appl. Bacteriol.* **71**:484-496.
- Campbell, R.** 1987. *Ecología Microbiana*. Ed. Limusa. México.
- Chapman, M.D., y T.A.E. Platts-Mills.** 1980. Purification and characterization of the allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen p1. *J. Immunol.* **125**:587-592.
- Cicero, R., y F. Cano.** 1992. Los efectos de la contaminación atmosférica en el aparato respiratorio, p. 267-278. *En* La contaminación atmosférica en México, sus causas y efectos en la salud. Comisión Nacional de Derechos Humanos. México.
- Ciceros-Fernández, P.** (1991). Prioritizing air pollutant controls for urban centers in developing countries: Mexico City as a case study. *En* 84th Annual Meeting and Exhibition Vancouver, British Columbia. Air and Waste Management Association. **115.10**:1-14.
- Clark, R.P., y S.G. Shirley.** 1973. Identification of skin in airborne particulate matter. *Nature*. **246**: 39-40.
- Colwell, R.R., P.R. Bryton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Huq, y L.M. Palmer.** 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio. Technology*. **3**:817-820.
- Cox, C.S.** 1987. *The Aerobiological pathway of microorganisms*. John Wiles & Sons. Gran Bretaña.
- Cox, C.S.** 1989. Airborne bacteria and viruses. *Sci. Prog.* **73**:469-500.
- Cravioto, A., R.E. Reyes, F. Trujillo, F. Uribe, A. Navarro, J.M. de la Roca, J.M. Hernández, G. Pérez, y V. Vázquez.** 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am. J. Epidemiol.* **131**:886-904.
- Crook, B., S. Higgins, y J. Lacey.** 1987. Airborne Gram-negative bacteria associated with the handling of domestic waste, p. 371-375. *En* Advances in Aerobiology. G. Boehm y R.M. Leuschner (ed), Birkhauser Verlag, Basel
- Crook, B., S. Higgins, y J. Lacey.** 1988. Methods for sampling airborne microorganisms at solid waste disposal sites, p. 791-797. *En* Biodeterioration 7. D. Houghton, R.N. Smith y H.O. Eggins (ed). Londres.
- Crook, B., y S .A. Olenchock.** 1995. Industrial Workplaces, p. 531-545. *En* Bioaerosols Handbook. C.S. Cox. y C.M. Mathes (ed). Lewis Publishers. Chelsea, Boca Raton, Florida.
- Csonka, L.N.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**:121-147.

- D'Aoust, J., J. Giroux, L. Barran, H. Schneider, y G. Martin. 1974. Some effects of visible light on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 120(2): 799-804.
- Dirección General de Epidemiología, S.S.A. 1991. Boletín Epidemiológico. Secretaría de Salubridad y Asistencia. 8.
- Dimmick, R.L., y A.B. Akers. 1969. An introduction to experimental Aerobiology. Wiley-Interscience. Wiley & Sons. Nueva York.
- Druett, H., y L. Packman. 1968. Sensitive microbiological detector for air pollution. *Nature.* 218(18):699.
- Edmonds, R.L. 1979. Aerobiology. The ecological system approach. Dowden, Hutchinson y Ross. Stroudburg. Pensilvania.
- Ehrlich, R., S. Miller, y R.L. Walker. 1970. Relationship between atmospheric temperature and survival of airborne bacteria. *Appl. Microbiol.* 19(2): 245-249.
- Ezcurra, E., y M. Mazari-Hiriart. 1996. Are megacities viable? A cautionary tale from Mexico City. *Environment.* 38:6-35.
- FAO. 1967. Food and agriculture organization of the United Nations. A practical manual of soil microbiology laboratory methods. Roma.
- Fannin, K.F., S.J. Gannon, K.W. Cochran, y J.C. Spendlove. 1976. Field studies on coliphages and coliforms as indicators of airborne animal viral contamination from wastewater treatment facilities. *Water Res.* 11:181-188.
- Fedorak, P.M., y D.W.S. Westlake. 1978. Effect of sunlight on bacterial survival in transparent air samplers. *Can. J. Microbiol.* 24 :618-619.
- Fedorak, P.M., y D.W.S. Westlake. 1980. Airborne bacterial densities at an activated sludge treatment plant. *J. Water Pollut. Control Fed.* 52(8):2185-2192.
- Fernández-Astorga, A., A. Muela, R. Cisterna, J. Iriberry, e I. Barcina. 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmids transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:392-398.
- Finch, J.E., J. Prince, y M. Hawksworth. 1978. A bacteriological survey of the domestic environment. *J. Appl. Bacteriol.* 45:357-364.
- Flannigan, B., E.M. McCabe, y F. McGarry. 1991. Allergenic and toxigenic microorganisms in houses. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement.* 70: 61S-73S.
- Flowers, T.J., P.R. Troke, y A.R. Yeo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28:89-121.
- Forster, H.W., B. Crook, B.W. Platts, J. Lacey, y M.D. Topping. 1989. Investigation of organic aerosols generated during sugar beet slicing. *Amm Ind. Hyg. Assoc. J.* 50(1):44-50.
- Freund, J. E. y R. Manning. 1989. Estadística. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. México.
- Fulton, J.D. 1966. Microorganisms of the upper atmosphere. III. Relationship between altitud and micropopulation. *Appl. Microbiol.* 14(2): 245-250.
- García-Peralta, B. 1987. Delegación Gustavo A. Madero, p 276-282. *En Atlas de la Ciudad de México.* G. Garza y Programa de Investigación Científica y

- Capacitación Técnica (ed). Departamento de Publicaciones del Colegio de México. México.
- Ghoul, M., T. Bernard, y M. Cormier.** 1990. Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycine betaine from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 551-554.
- Godish, D., T. Godish, B. Hooper, C. Panter, M. Cole, y M. Hooper.** 1993. Airborne mold and bacteria levels in selected houses in the Latrobe Valley, Victoria, Australia, p. 171-175. *En Indoor Air'93*, Helsinki, Finlandia.
- Gregory, P.H.** 1973. *The microbiology of the atmosphere*, 2a Ed. Leonard Hill Books. Aylesbury, Bucks. Gran Bretaña.
- Groschel, D.H.** 1980. Air sampling in hospitals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. R.B. Kundson (ed). EUA. **353**: 230-240.
- Haberberger, R.L., I.A. Mikhail, y T.F. Ismail.** 1991. Enteritis due to multiresistant enteroadherent *Escherichia coli*. *Lancet.* **337**:235-236.
- Harnett, D.L. y J.L. Murphy.** 1987. *Introducción al análisis estadístico*. Addison-Wesley Iberoamericana. EUA.
- Hatch, M.Y., y R.L. Dimmick.** 1966. Physiological responses of airborne bacteria to shifts in relative humidity. *Bacteriol. Rev.* **30**(3): 597-603.
- Hedberg, C.W., S.J. Savarino, J.M. Besser, C.J. Paulus, V.M. Thelen, L.J. Myers, D.N. Cameron, T.J. Barrett, J.B. Kaper, y M.T. Osterholm.** 1997. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39 :NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E.coli*. *J. Infect. Dis.* **176** :1625-1628.
- Hickey, J.L., y P.C. Reist.** 1975. Health significance of airborne microorganisms from wastewater treatment processes. Part II: Health significance and alternatives for action. *J. Water Pollut. Control Fed.* **47**(12):2758-2773.
- Hood, M.A.** 1990. Gram negative bacteria as bioaerosols, p. 60-67. *En Biological contaminants in indoor environments*. Morey, P.R., J.C.
- Hullan, S., Z.L. Guang, y A. Mathan.** 1991. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries : a multicentre study in five countries. *Bull WHO*, **89** :542.
- Hunter, C.A., C. Grant, B. Flannigan, y A.F. Bravey.** 1988. Mould in buildings: the air spora of domestic dwellings. *Int. Biodet.* **24**: 81-101.
- Hunter, C.A., A.V.Hull, R.G. Lea, y I.G. Jeffrey.** 1993. Identification of the range and concentration of micro-organisms and mites in representative mould-free properties. Ninth International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Leeds, Reino Unido.
- Hunter, C.A., A.V. Hull, D. Highman, y C. Grimes.** 1995. The abundance of bacteria in homes in the Avon Area of the U.K., p. 71-74. *En L. Morawska, N.D. Bofinger y M. Maroni (ed), Indoor Air, An Integrated Approach*. Elsevier Science, Ltd. Reino Unido.

- Ibarra, V. 1987. Delegación Tlalpan, p 310-314. *En Atlas de la Ciudad de México*. G. Garza y Programa de Investigación Científica y Capacitación Técnica (ed). Departamento de Publicaciones del Colegio de México. México.
- Imhoff, J.F. 1986. Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**:57-66.
- Imshenetsky, A.A., S.V. Lysenko, y G.A. Kazakov. 1978. Upper boundary of the biosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**(1): 1-5.
- Jacobs, R.R. 1994. Risk environments, p. 3-15. *En Organic Dust, Exposure, Effects and Prevention*. R. Rylander y R. Jacobs (ed). Lewis Publishers. Boca Ratón, Florida.
- Jáuregui, E. 1975. El clima urbano de la Ciudad de México. *Boletín del Instituto de Geografía.* **6**:47-58.
- Jáuregui, E. 1987. El clima de la Ciudad de México. *En Atlas de la Ciudad de México*. G. Garza y Programa de Investigación Científica y Capacitación Técnica (ed). Departamento de Publicaciones del Colegio de México. México.
- Jáuregui, E. 1989. The dust storms of Mexico City. *J. Climatol.* **8** :169-180.
- Jáuregui, E. 1995. Algunas alteraciones de largo período del clima de la Ciudad de México debidos a la urbanización. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía.* **31** :9-44.
- Jáuregui, E. y E. Luyando. 1992. Patrones de flujo de aire superficial y su relación con el transporte de contaminantes en el Valle de México. 1992. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía.* **24** :51-78.
- Jobling, M.G., S.E. Peters, y D.A. Ritchie. 1988. Plasmid-borne mercury resistance in aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**:31-37.
- Jones, B.L., y J.T. Cookson. 1983. Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(3): 919
- Kelly, C.D., y S.M. Pady. 1954. Microbiological studies of air masses over Montreal during 1950 and 1951. *Can. J. Bot.* **32**:591-600.
- Kelsen, S.G. 1980. The role of airborne bacteria in the contamination of fine particle nebulizers and the development of nosocomial pneumonia.. *Ann. New York Acad. Science.* R.B. Kundsinn (ed). **EUA. 353**: 218-229.
- Lacey, J. 1989. The detection of airborne allergens. Final report to the health and safet. Crop Protection Division, Institute of Arable Crops Research, Rothamsted Experimental Station.
- Lacey, J., y M. Lacey. 1987. Micro-organisms in the air of cotton mills. *Ann. Occup. Hyg.* **31**(1): 1-19.
- Law, D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 152-173.
- Lighthart, B. 1971. The survival of airborne *Serratia marcescens* in urban concentration of sulfur dioxide. *J. Air Pollut. Control Assoc.* **21**(10): 639-642.
- Lighthart, B. 1973. Survival of airborne bacteria in a high urban concentration of carbon monoxide. *Appl. Microbiol.* **25**:86-91.

- Lighthart, B., y A.J. Mohr.** 1994. Atmospheric microbial aerosols, theory and applications. Chapman & Hall. Nueva York.
- Lindemann, J., A. Constantinidou, W.R. Barchet, y C.D. Upper.** 1982. Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(5): 1059-1063.
- Lindemann, J., y C.D. Upper.** 1985. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(5):1229-1232.
- Mac Faddin, J.E.** 1984. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana. México.
- McDade, J., y L. Hall.** 1964. Survival of Gram-negative bacteria in the environment. *Ann. J. Hyg.* 80:192-204.
- Macher, J.M., F. Huang, y M. Flores.** 1991. A two-year study of microbiological indoor air quality in a new apartment. *Arch. Environ. Health.* 46:25-29.
- Macher, J.M., A.J. Streitl, y V. Vesley.** 1995. Problem buildings, laboratories and hospitals, p. 505-530. *En Bioaerosols Handbook.* Cox, C.S. y C.M. Wathes (ed). Lewis Publishers, Chelsea. Boca Raton, Florida.
- Mancinelli, R. L., y W.A. Shulls.** 1978. Airborne bacteria in an urban environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 35(6):1095
- Maroni, M., M. Bersani, D. Cavallo, A. Anversa, y D. Alcini.** 1993. Microbial contamination in buildings: comparison between seasons and ventilation systems, p. 137-142. *En Indoor Air'93.* Helsinki, Finlandia.
- Marthi, B., V.P. Fieland, M. Walter, y R.J. Seidler.** 1990. Survival of bacteria during aerolization. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(11):3463-3467.
- Marthi, B., y B. Lighthart.** 1990. Effects of betaine on enumeration of airborne bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1286-1289.
- Marthi, B., B. Shaffer, B. Lighthart, y L. Ganio.** 1991. Resuscitation effects of catalase on airborne bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2775-2776.
- May, G., E. Faatz, M. Villarejo, y E. Bremer.** 1986. Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen Genet.* 205:225-233.
- Miller, J.D.** 1992. Fungi and the building engineer. *En IAQ'92. Environments for people,* p. 147-159. ASHRAE, Inc. Atlanta, EUA.
- Muilenberg, M.L.** 1995. The outdoor aerosol, p. 25-47. *En Bioaerosols.* H. A. Burge (ed). CRC Press, Inc. USA.
- Munro, P.M., M.J. Gauthier, V.A. Breittmayer, y J. Bongiovanni.** 1989. Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2017-2024.
- Muñoz, O., F. Solórzano, H. Díaz, y J. Torres.** 1996. Síndrome disentérico y diarrea aguda con sangre, p. 59-66. *En Enfermedades diarreicas en el niño.* L.F. Torregrosa, J.I. Santos-Précido, R. Rodríguez, L. Velasquez, J. García y C. Alpuche (ed). 10a ed. Interamericana Mc. Graw-Hill. México.

- Murray, R., D. Brenner, M. Bryant, J. Holt, N. Krieg, J. Moulder, N. Pfenning, P. Sneath, y J. Staley. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. Londres. Vol. 1.
- Niemela, S.I., P. Vaatanen, J. Mentu, A. Jokinen, P. Jappinen, y P. Sillanpaa. 1985. Microbial incidence in upper respiratory tracts of workers in the paper industry. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(1):163-168.
- O'Leary, W.M. 1989. *Practical Handbook of Microbiology*. CRS Press, Inc. EUA.
- Pérez, J., R. Vázquez, C. Rodríguez, R. Miranda, A. Romo, y E. Nader. 1987. Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, UNAM. México.
- Peterson, M. 1974. Soiled disposable diapers: a potential source of virus. *Amer. J. Public Health.* **64**:912-914.
- Preece, T.P., y Dickinson. 1971. *Ecology of leaf surface microorganisms*. Academic Press, Nueva York.
- Ragsdale, M., K. Page, S. Laflam, y J. Smrekar. 1995. Impact of carpet cleaning on indoor air quality, p. 289-292. *En Bioaerosols*. H. A. Burge (ed). CRC Press, Inc. USA.
- Randall, C.W., y J.O. Ledbetter. 1966. Bacterial air pollution from activated sludge units. *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.* **27**: 506-519.
- Rapoport, H. E., E.M. Díaz-Betancourt, y R.I. López-Moreno. 1983. Aspectos de la Ecología urbana de la Ciudad de México. Editorial Limusa. México.
- Reponen, T., A. Nevalainen, y T. Raunemmaa. 1989. Bioaerosol and particle mass levels and ventilation in Finnish Homes. *Envir. Int.* **15**:203-208.
- Reponen, T., A. Nevalainen, M. Janrunen, M. Pellikka, y P. Kalliokoski. 1990. Proposal for an upper limit of the normal range of indoor air bacteria and fungal spores in subarctic climate, p. 47-50, *En Indoor Air'90: Proceedings of the 5th International Conference on Indoor Air Quality and Climate*, V.2. Ottawa.
- Rhoads, D.B., F.B. Waters, y W. Epstein. 1976. Cation transport in *Escherichia coli*. VIII. Potassium transport mutants. *J. Gen. Physiol.* **67**:325-341.
- Rivera, S.C., T.C. Hazen, y G.A. Toranzos. 1988. Isolation of fecal coliforms from pristine sites in a tropical rain. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(2):513-517.
- Rosas, I., S. Gutiérrez, A. Yela, M. Selman, L. Teran y A. Mendoza. 1988. Respuesta de los trabajadores a los microorganismos suspendidos en la atmósfera de una fábrica de papel. *Arch. Invest. Méd. México.* **19**: 23-31.
- Rosas, I. y A. Yela. 1989. Aerosol containing enteric bacteria generated by wastewater treatment process. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Q-46.
- Rosas, I., A. Yela, y C. Santos-Burgoa. 1994 a. Occurrence of airborne enteric bacteria in Mexico City. *Aerobiologia, The European Journal of Aerobiology.* **10**(1):39-45.
- Rosas, I., A. Yela, E. Salinas y E. Calva. 1994. b Bacterias entéricas en la atmósfera. *Ciencia y Desarrollo. México.* **XX**(118):52-57.

- Rosas, I., C. Calderón, E. Salinas y J. Lacey. 1996. Airborne microorganisms in a domestic waste transfer station. p. 89-98. *En* Müllenberg, M. y H. Burge (ed). Aerobiology: Proceedings of the Pan-American Aerobiology Association. CRC, Lewis Publishers. EUA.
- Rosas, I., C. Calderón, L. Martínez, M. Ulloa y J. Lacey. 1997. Indoor and outdoor airborne fungal propagule concentrations in Mexico City. *Aerobiologia, International Journal of Aerobiology*. 13 :23-30.
- Roth, W.G., M.P. Leckie y D.N. Dietzier. 1988. Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:3142-3146.
- Rylander, R. 1994. Office and domestic environments, p. 247-255. *En* Organic dust: exposure, Effects and prevention. CRC Press, Inc.
- Rylander, R., y R. Burrell. 1988. Endotoxins in inhalation research. Summary of conclusions of a workshop held at Clearwater Florida. *Ann. Occup. Hyg.* 32(4): 553-556.
- Schoeni, J.L., y M.P. Doyle. 1994. Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2958-2962.
- Shoemaker, N.B., G. Wang, y A.A. Salyers. 1992. Evidence for natural transfer of a tetracycline resistance gene between bacteria from the human colon and bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol* 58: 1313-1320.
- Singh, K.V., R.R. Reves, L.K. Pickering, y B.E. Murray. 1992. Identification by DNA sequence analysis of a new plasmid-encoded trimethoprim resistance gene in fecal *Escherichia coli* isolated from children in day -care centers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1720-1726.
- Taylor, D., y P. Echeverria. 1986. Etiology and epidemiology of traveler's diarrhoea in Asia. *Rev. Inf. Dis.* 8:136.
- Torres, J., S. González-Arroyo, R. Pérez, y O. Muñoz. 1995. Inappropriate treatment in children with bloody diarrhea: clinical and microbial studies. *Arch. Med. Res.* 26:23-29.
- Valentini, S.R., T.A. Gomes, y D.P. Falcão. 1992. Lack of virulence factors in *Escherichia coli* strains of enteropathogenic serogroups isolated from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:412-414.
- Walter, M., B. Marthi, V. Fieland, y L. Ganio. 1990. Effect of aerolization on subsequent bacterial survival *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3468-3472.
- Willeke, K., y P.A. Baron. 1987. The size distribution of whirlpool-generated droplets, their ability to contain bacteria and their deposition potential in the human respiratory tract, p. 361-364. *En* Advances in Aerobiology. Birkhauser Verlag Basel.
- Wood, J.M. 1988. Proline porters affect the utilization of proline as a nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J. Membrane Bio.* 106:183-202.

- Wright, T.J., V.W.Greene, y H.J. Paulus.** 1969. Viable microorganisms in an urban atmosphere. *J. Air. Pollut. Control. Assoc.* **19**(5):337-341.
- Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus, y G.N. Somero.** 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* **217**:1214-1227.
- Yongyi, T., C. Fengxiang, X. Xiuzhi, C. Mieleng, Y. Binyan, y J. Li.** 1993. Population study of atmospheric bacteria at the Fengtai district of Beijing on two representative days. *Aerobiologia.* **9**:69-74.
- Ziccardi, A.** 1987. Delegación Cuauhtémoc, p 265-270. *En Atlas de la Ciudad de México.* G. Garza y Programa de Investigación Científica y Capacitación Técnica (ed). Departamento de Publicaciones del Colegio de México. México.

## ANEXO A

Lámina I : Muestreo de partículas biológicas suspendidas en la atmósfera.

- A) Impactador de cascada Andersen de dos etapas (Graseby Andersen, Atlanta, Ga.) para el muestreo de aeropartículas viables.
- B) Medio de cultivo general para el desarrollo de bacterias mesófilas cultivables.

Lámina II : Muestreo de partículas depositadas.

- A) Aspiradora VK-121 (Vorwerk, Madrid España).
- B) Tratamiento de las muestras de polvo en el laboratorio : preparación de diluciones e inoculación en el medio de cultivo selectivo para bacterias entéricas.



LÁMINA I: Muestreo de partículas biológicas suspendidas en la atmósfera.

A

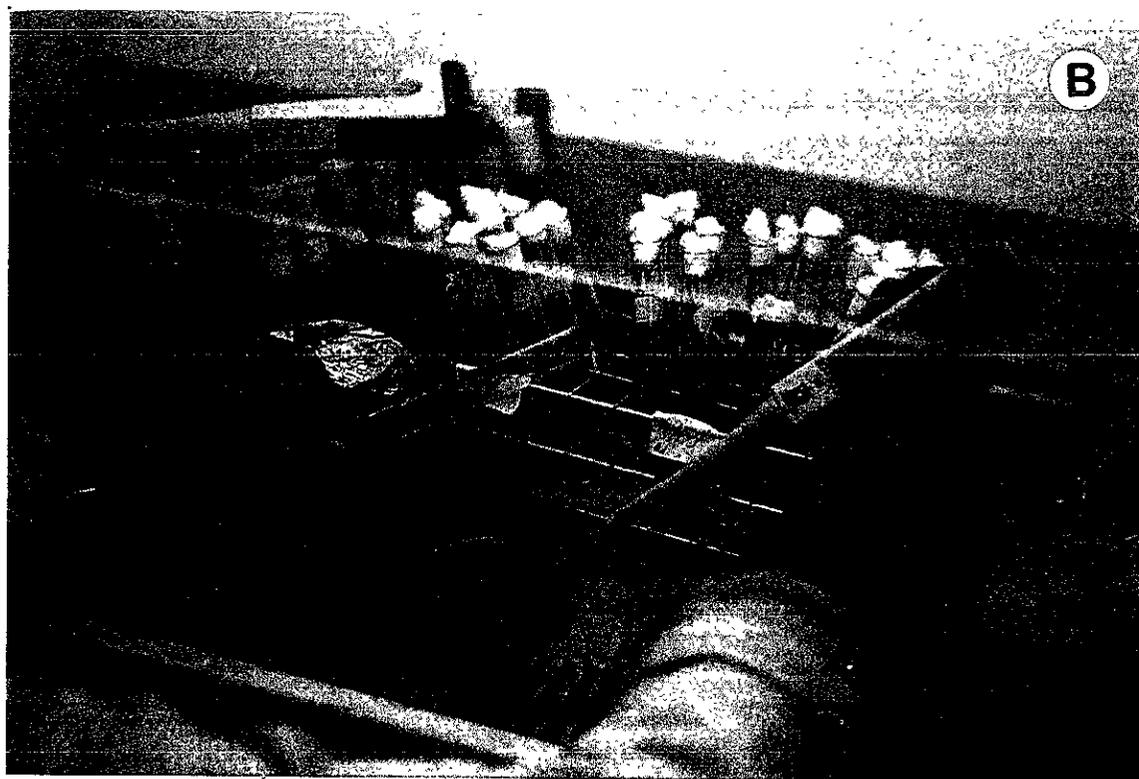
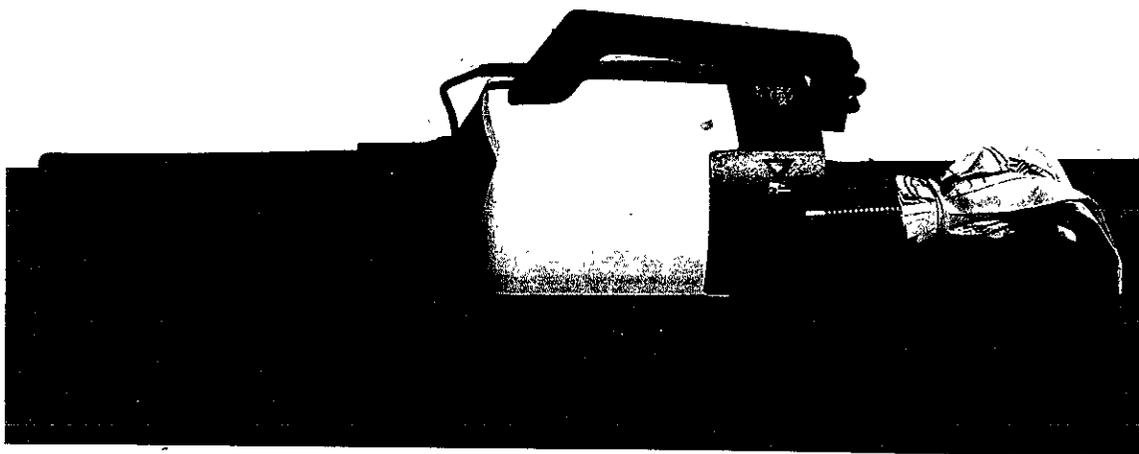


LÁMINA II : Muestreo de partículas depositadas.

## **ANEXO B**

Manual del equipo UniScept KB Gram-negative / type 2 (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) para el análisis de resistencia antimicrobiana.

**UNISCEPT® KB/TYPE 2**

For In Vitro Diagnostic Use

**INTENDED USE**

UniScept® KB is a clinical laboratory *in vitro* antimicrobial susceptibility test. It utilizes the broth-microdilution procedure for determining susceptibility patterns of rapidly growing, non-fastidious aerobic and facultative anaerobic bacteria. UniScept KB is available for both gram-negative and gram-positive organisms. The antimicrobials contained in this system were selected based upon their performance and acceptance by clinical laboratories, their correlation to conventional agar diffusion susceptibility methods and empirical testing. UniScept KB results are reported as qualitative susceptibilities: susceptible (S), intermediate (I) or resistant (R).

**PRINCIPLES AND COMPONENTS**

The UniScept KB system is comprised of a 40 well tray containing a series of antimicrobial agents suspended in growth media and lyophilized. Each antimicrobial agent is present in one or two dilutions designed to produce results equivalent to the Kirby-Bauer method (1,2,3,4). For antimicrobials in two dilutions, the low concentrations can be found in the row designated as "L" while the high concentrations are in the "H" row. Each tray also contains a growth control well. A detailed outline of the gram-negative tray is shown below.

**UNISCEPT® KB GRAM-NEGATIVE/TYPE 2**

Product No.: V 7300 - 25 determinations/box

Product No.: V 7301 - 100 determinations/box

| Well No. | ABBR. | Antimicrobial                 | Concentration µg/ml |      | Supplement                         |
|----------|-------|-------------------------------|---------------------|------|------------------------------------|
|          |       |                               | L                   | H    |                                    |
| 1        | SXT   | Trimethoprim/Sulfamethoxazole | 2/38                | 4/76 | Thymidine<br>Phosphorylase         |
| 2        | F/M   | Nitrofurantoin                | 25                  | 50   |                                    |
| 3        | NOR   | Norfloxacin                   | 4                   | 8    |                                    |
| 4        | CIP   | Ciprofloxacin                 | 1                   | 2    |                                    |
| 5        | AM    | Ampicillin                    | 8                   | 16   |                                    |
| 6        | TIC   | Ticarcillin                   | 16                  | 64   |                                    |
| 7        | PIP   | Piperacillin                  | 64                  | 128  |                                    |
| 8        | CF    | Cephalothin                   | 8                   | 16   |                                    |
| 9        | CZ    | Cefazolin                     | 8                   | 16   |                                    |
| 10       | FOX   | Cefoxitin                     | 8                   | 16   |                                    |
| 11       | CXM   | Cefuroxime                    | 8                   | 16   |                                    |
| 12       | CTX   | Cefotaxime                    | 8                   | 32   |                                    |
| 13       | CAZ   | Ceftazidime                   | 8                   | 16   |                                    |
| 14       | AN    | Amikacin                      | 16                  | 32   | Ca <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup> |
| 15       | GM    | Gentamicin                    | 4                   | 8    | Ca <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup> |
| 16       | NN    | Tobramycin                    | 4                   | 8    | Ca <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup> |
| 17       | C     | Chloramphenicol               | 12                  | 24   |                                    |
| 18       | Te    | Tetracycline                  | 4                   | 8    |                                    |
| 19       | IPM   | Imipenem                      | 4                   | 8    |                                    |
| 20L      | GC    | Growth Control                | +                   |      |                                    |

Nutrient Medium=Mueller Hinton Broth Supplemented with a Block Copolymer Surfactant

**bioMérieux Vitek, Inc.**

595 Anglum Drive, Hazelwood

Missouri 63042-2395, USA

Phone: 314/731-8500 800/638-4835

Fax: 314/731-8700

Insert No. 007783-3

(Rev. 0195). Use this Insert

with Product No. V 7300 and V 7301

To determine the susceptibility of an organism to an antimicrobial, each well of the tray is inoculated with 100µl of a standardized suspension of the organism. The trays are incubated for 18-24 hours at 35-37°C and each well is read for the presence or absence of growth. Interpretation for antimicrobials with two concentrations is as follows: growth in both concentrations is recorded as "R" (resistant); growth in the low but not the high concentration is recorded as "I" (intermediate) and the absence of growth in the two concentrations is recorded as "S" (susceptible). If there is no growth in the low concentration but growth in the high, the result is invalid and should not be reported.

### PRECAUTIONS

The UniScept KB trays are for *in vitro* diagnostic use only. They are to be used by qualified laboratory personnel using aseptic techniques and established precautions against microbiological hazards. After use, contaminated materials should be autoclaved, incinerated or immersed in germicide prior to disposal.

Care should be used when handling the tray. Hold the tray by the sides or bottom. If the integrity of the pouch is compromised, discard the tray.

**WARNING:** All patient specimens and microbial cultures are potentially infectious and should be treated with universal precautions (NCCLS M29-T2; CDC Manual: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1988).

The performance data presented were obtained using the procedure indicated. Any change or modification in the procedure may affect the results.

### STORAGE AND SHELF LIFE

The Uniscept KB Product should be stored at room temperature (15-30°C). Product stored as directed will retain activity until the expiration date printed on the tray pouch. Upon opening the sealed pouch, the pellets should appear to be dry, white, straw or yellow in color. Product displaying pellets with shrinkage or discoloration should be discarded. Once the pouch is opened, any trays that are not used immediately should be returned to the pouch. The pouch should be taped closed and placed in a jar with desiccant. Trays may be stored in this manner up to 5 days.

### SPECIMEN COLLECTION AND PROCESSING

Regardless of their source, specimens should be transported to the laboratory immediately after collection, and processed as soon as possible following receipt. Although methods of processing specimens may vary somewhat from laboratory to laboratory, proper selection of plating media and conditions of incubation are important (2). Specimens should be collected prior to administering antibiotic therapy (1,2,3,4).

### MATERIALS

The following materials are provided with the UniScept KB system: 25 pouched trays with covers and a package insert. Also needed are common laboratory materials not provided with the UniScept system:

- Sterile 0.85% Saline (pH 5.5-7.0)
- Sterile Distilled Water
- 0.5 McFarland Standard (BaSO<sub>4</sub>)
- Blood Agar Plates (BAP)
- Inoculating Loop
- Sterile Cotton Swabs
- Sterile Applicator Sticks
- Sterile Serological Pipettes
- Pipettor and Sterile Tips
- Seed Trays
- Vortex Mixer
- Capped Sterile Test Tubes
- Test Tube Rack
- Marking Pens
- Burner (Bunsen or Meker)
- Mirror Reader
- Illuminating Lamp
- Incubation Chamber
- Incubator (35-37°C, non-CO<sub>2</sub>)

The following materials have been designed for use with the UniScept® KB system and are available from bioMérieux Vitek:

|                                                              |                    |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| UniScept® Autoinoculator II                                  | Product No. V 7703 |
| UniScept® Autoinoculator Syringes,<br>Needles and Purge Cups | Product No. V 7455 |
| UniScept® Ten-Tip Inoculator (100µl)                         | Product No. V 7701 |
| UniScept® Ten-Tip Inoculator Tips<br>and Seed Trays          | Product No. V 7451 |
| MultiELECTRAPETTE®                                           | Product No. V 7702 |
| Tips in Racks                                                | Product No. V 7452 |
| Seed Trays                                                   | Product No. V 7454 |
| Bulk Tips                                                    | Product No. V 7453 |
| UniScept® Mirror Reader                                      | Product No. V 7704 |
| UniScept® 20E®                                               | Product No. 60 009 |
| UniScept® ID Strip Holders and Lids                          | Product No. V 7509 |
| Saline (5ml)                                                 | Product No. 20 220 |
| UniScept® Saline Solution (24.75 ml)                         | Product No. V 7450 |
| UniScept® KBGN/TYP E 2 + 20E®<br>Report Form                 | Product No. V 7500 |
| UniScept® Incubation Chamber                                 | Product No. V 7513 |
| UniScept® dezine-er™ System (UDS)                            | Product No. V 7707 |

## RECOMMENDED PROCEDURE

### A. Preparation of the UniScept KB Tray

Remove the tray from the pouch and place it on the laboratory bench. Tap the top of the tray before peeling off the cover to release any pellets clinging to the cover. Peel off the plastic cover and retain. Inspect the tray to insure it meets the criteria outlined in the Storage and Shelf Life section. Record the specimen code on the frosted portion of the tray. Replace the plastic cover until ready to inoculate the tray.

### B. Preparation of Inoculum

Use a sterile applicator stick, flamed inoculating loop or sterile cotton swab to pick a sufficient number of colonies from a pure culture on non-selective media which has been incubated for 18-24 hours at 35-37°C. Suspend the colonies in 5ml of 0.85% sterile saline or sterile distilled water. The resultant suspension should be standardized to the equivalent of a No. 0.5 McFarland (BaSO<sub>4</sub>) turbidity standard. Mix the contents of the tube thoroughly. Use a sterile pipette to prepare a 1:100 dilution of the inoculum in the appropriate volume of sterile 0.85% saline (pH 5.5-7.0). Mix thoroughly. The final concentration of this inoculum is approximately 1x10<sup>6</sup> CFU/ml. This inoculum must be used within 15 minutes of preparation.

**NOTE:** IN PREPARATION OF THE McFARLAND STANDARD, CAREFUL ATTENTION MUST BE GIVEN TO THE QUALITY OF THE REAGENTS AND ACCURACY OF THE MEASUREMENTS. THE STANDARD DETERIORATES AND SHOULD BE STORED AT ROOM TEMPERATURE IN THE DARK IN SEALED GLASS TUBES OR AMPULES (5). SALINE CONTAINING PRESERVATIVES, BUFFERS OR BACTERIOSTATIC AGENTS SHOULD NOT BE USED FOR PREPARATION OF BACTERIAL SUSPENSIONS. THE ABOVE PROCEDURE FOR PREPARATION OF INOCULUM MUST BE USED WITH THE UNISCEPT KB SYSTEM.

### C. Inoculation of Tray

1. To inoculate using UniScept Autoinoculator II, MultiELECTRAPETTE or UniScept Ten-Tip Inoculator, refer to the respective package insert for these devices.
2. To inoculate using a manual pipetting device:
  - a. Pour the inoculum into a seed tray. (If one is to be used).
  - b. Set tip firmly on the inoculator barrel.
  - c. Carefully draw up the prescribed volume into the tip. Avoid drawing up any air bubbles, as they will interfere with the accurate delivery of the inoculum.

- d. Carefully discharge 100 µl of inoculum into each well. Since the tip will be used to inoculate a series of wells, avoid touching the tip to the contents of the well. Refill the tip as necessary.
- e. Use the excess bacterial suspension to inoculate a Blood Agar Plate (BAP) as a purity check. Incubate the plate for 18-24 hours at 35-37°C.
- f. Place contaminated tip and seed tray into a discard receptacle for later decontamination.

#### **D. Incubation of Trays**

1. Replace the plastic cover on the UniScept KB tray.
2. Incubate in the UniScept Incubation Chamber or equivalent for 18-24 hours at 35-37°C in a non-CO<sub>2</sub> incubator.

**NOTE:** TO PREVENT EVAPORATION, THE UNISCEPT KB TRAY MUST BE INCUBATED IN THE UNISCEPT INCUBATION CHAMBER OR EQUIVALENT. TRAYS MUST NOT BE STACKED MORE THAN FOUR (4) HIGH IN THE INCUBATION CHAMBER IN ORDER TO MAINTAIN A CONSISTENT TEMPERATURE.

#### **E. Reading the Trays**

Following incubation, trays are read for the ability of the microorganism to grow in the presence of the antimicrobials.

Growth can appear as:

- dense or hazy turbidity, uniformly distributed throughout the well; or
- concentrated or diffuse buttons of bacterial growth at the bottom of the well; or
- diffuse patterns of bacteria scattered throughout the well.

The absence of any turbidity is considered "no growth".

#### **EXCEPTIONS:**

- Extremely small buttons in every well are sometimes encountered with Trimethoprim/Sulfamethoxazole and indicate limited growth before the onset of bacteriostasis. This type of growth should be disregarded and the well reported as negative.

Trays should be read for growth by viewing each well through the bottom using a mirror reader. An overhead light source, adjusted to give the best contrast should be used. Wipe off any condensation that may occur on the bottom of the tray.

1. Remove the plastic cover slowly and carefully.
2. Place the tray on a mirror reader and adjust the light and mirror to give the best contrast.
3. Transcribe the specimen code onto the report form and fill in all required information.
4. Read and record the positive growth control well (L20). The absence of growth in this well invalidates all results.
5. Record results starting with the first antimicrobial, reading the required concentrations. Results can be recorded by placing an X in the appropriate well on the report form diagram. Continue until all antimicrobials are read and recorded. Refer to the UniScept® dezine-er™ System Operator's Manual for entry of results.

6. With the EXCEPTIONS noted above, the results are interpreted as follows:

| <u>L</u>  | <u>H</u>  | <u>INTERPRETATION</u> |
|-----------|-----------|-----------------------|
| No Growth | No Growth | S                     |
| Growth    | No Growth | I                     |
| Growth    | Growth    | R                     |
| No Growth | Growth    | Invalid               |

7. After all results have been recorded, the entire UniScept KB tray must be autoclaved, incinerated or immersed in a germicide prior to disposal.

#### **QUALITY CONTROL OF THE UNISCEPT KB SYSTEM**

Antimicrobials incorporated into the UniScept KB system are quality controlled at bioMérieux Vitek according to standard procedures prior to use in the system. Furthermore, each lot of product is quality controlled by in-house testing using stock cultures with known KB results. For user quality control of the UniScept KB system, we recommend the following cultures from the American Type Culture Collection (ATCC):

##### UniScept KB Gram Negative/TYPE 2

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35422

*Escherichia coli* ATCC 35421

Microorganisms should be maintained as described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (4). The inoculation, reading and interpretation of KB trays tested for user quality control should be performed as described in preceding sections.

We recommend that NCCLS guidelines are followed for the frequency of quality control testing. Variation outside stated endpoint ranges indicates that the antimicrobial is out of control and should not be reported for that day.

**TABLE 1. ACCEPTABLE CONTROL ORGANISM ENDPOINTS CHART  
UNISCEPT KB GRAM-NEGATIVE/TYPE 2**

| Well<br>No. | ANTIMICROBIAL                     | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>Ps.</i>                         | <i>Ps.</i>                         |
|-------------|-----------------------------------|----------------|----------------|------------------------------------|------------------------------------|
|             |                                   | ATCC<br>35421  | ATCC<br>25922  | <i>aeruginosa</i><br>ATCC<br>27853 | <i>aeruginosa</i><br>ATCC<br>35422 |
| 1           | Trimethoprim/<br>Sulfamethoxazole | S              | S              | R                                  | -                                  |
| 2           | Nitrofurantoin                    | S              | S              | R                                  | R                                  |
| 3           | Norfloxacin                       | -              | S              | S                                  | -                                  |
| 4           | Ciprofloxacin                     | -              | S              | S                                  | -                                  |
| 5           | Ampicillin                        | R              | S              | R                                  | R                                  |
| 6           | Ticarcillin                       | R              | S              | SI <sup>a</sup>                    | -                                  |
| 7           | Piperacillin                      | R              | S              | S                                  | S                                  |
| 8           | Cephalothin                       | R              | SI             | R                                  | R                                  |
| 9           | Cefazolin                         | -              | S              | R                                  | R                                  |
| 10          | Cefoxitin                         | SI             | S              | R                                  | R                                  |
| 11          | Cefuroxime (Sodium)               | -              | S              | -                                  | R                                  |
| 12          | Cefotaxime                        | S              | S              | -                                  | IR                                 |
| 13          | Ceftazidime                       | -              | S              | -                                  | SI                                 |
| 14          | Amikacin                          | SI             | S              | S                                  | -                                  |
| 15          | Gentamicin                        | R              | S              | S                                  | R                                  |
| 16          | Tobramycin                        | R              | S              | S                                  | R                                  |
| 17          | Chloramphenicol                   | SI             | S              | R                                  | R                                  |
| 18          | Tetracycline                      | S              | S              | IR                                 | R                                  |
| 19          | Imipenem                          | -              | S              | S                                  | -                                  |
| 20L         | Growth Control                    | +              | +              | +                                  | +                                  |

<sup>a</sup> NCCLS (5) control limit is S for this strain/antimicrobial

#### LIMITATIONS

The UniScept KB Gram-negative/Type 2 system should only be used to test non-fastidious rapidly growing bacteria (i.e., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp.) Obligate anaerobes, capnophiles, *Neisseria* spp. or *Haemophilus* spp. should not be used in the UniScept KB system.

These antimicrobial/organism combinations are contraindicated in the UniScept KB Gram-negative/Type 2 product due to a high incidence of false resistance: cefazolin when testing *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., and *Providencia* spp.; ceftazidime when testing *Serratia* spp., ticarcillin when testing *P. vulgaris*; piperacillin when testing *Providencia* spp.; ciprofloxacin when testing *X. maltophilia*; cefuroxime when testing *E. cloacae*, *Acinetobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Serratia* spp.

These antimicrobial/organism combinations are contraindicated in the UniScept KB Gram-negative/Type 2 product due to high incidence of false susceptibility: tetracycline when testing *Pseudomonas* spp; norfloxacin when testing *X. maltophilia*; ampicillin when testing *Acinetobacter* spp.

Nitrofurantoin and norfloxacin should only be used to test organisms recovered from urinary tract infections (4).

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of the UniScept KB Gram-negative/Type 2 system has been established in a multiphase evaluation. The UniScept KB system demonstrated excellent correlation with disk diffusion susceptibility tests: all antimicrobials showed  $\geq 90\%$  agreement. In addition, both gram-negative trays demonstrated  $\geq 90\%$  reproductibility when compared to the reference susceptibility test method.

**TABLE 2. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF INDIVIDUAL ANTIMICROBIALS ON THE UNISCEPT KB GRAM-NEGATIVE/TYPE 2 TRAY COMPARED TO THE KIRBY-BAUER REFERENCE DISK DIFFUSION TEST (3,4)**

|                                   | <u>Total No.<br/>Gram-Negative<br/>Organisms Tested</u> | <u>Total No.<br/>of Tests</u> | <u>%<br/>Category<br/>Agreement<sup>a</sup></u> |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------|
| Trimethoprim/<br>Sulfamethoxazole | 94                                                      | 158                           | 96.2                                            |
| Nitrofurantoin                    | 94                                                      | 158                           | 94.9                                            |
| Norfloxacin                       | 297                                                     | 297                           | 98.6                                            |
| Ciprofloxacin                     | 297                                                     | 297                           | 98.0                                            |
| Ampicillin                        | 94                                                      | 158                           | 96.8                                            |
| Ticarcillin                       | 176                                                     | 176                           | 97.7                                            |
| Piperacillin                      | 93                                                      | 157                           | 92.4                                            |
| Cephalothin                       | 94                                                      | 158                           | 96.2                                            |
| Cefazolin                         | 176                                                     | 176                           | 97.7                                            |
| Cefoxitin                         | 94                                                      | 158                           | 92.4                                            |
| Cefuroxime                        | 269                                                     | 269                           | 93.7                                            |
| Cefotaxime                        | 94                                                      | 158                           | 92.4                                            |
| Ceftazidime                       | 299                                                     | 299                           | 98.0                                            |
| Amikacin                          | 94                                                      | 158                           | 98.1                                            |
| Gentamicin                        | 94                                                      | 158                           | 94.3                                            |
| Tobramycin                        | 94                                                      | 158                           | 90.5                                            |
| Chloramphenicol                   | 94                                                      | 158                           | 93.0                                            |
| Tetracycline                      | 94                                                      | 158                           | 98.7                                            |
| Imipenem                          | 367                                                     | 367                           | 95.9                                            |

<sup>a</sup> Category Agreement=Identical agreement between the UniScept KB Gram-Negative System and the reference test method.

## REFERENCES

1. Barry, A.L., 1976. *The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices*. Lea and Febiger Pub., Philadelphia, PA.
2. *Manual of Clinical Microbiology* (5th Edition) 1991. A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (Eds) American Soc. Microbiol., Washington D.C.
3. NCCLS 1984. Approved Standard M2-A3 (3rd Ed.). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
4. NCCLS. 1990. Approved Standard M2-A4. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
5. NCCLS. 1992 Fourth Informational Supplement M100-S4. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.

## PROCEDURE FOR UNISCEPT KB TRAY/STRIP HOLDER ASSEMBLY FOR COMBINATION TESTING

### Preparation of the UniScept KB Plus System

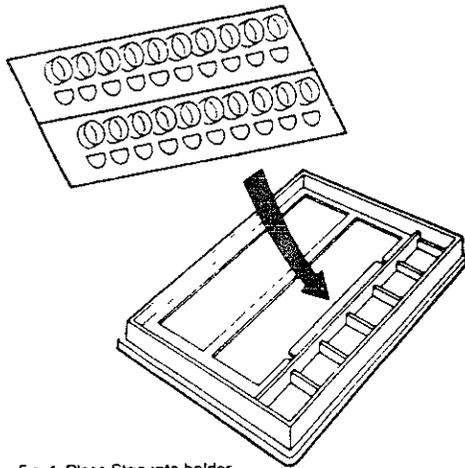
Remove the UniScept KB Tray from the pouch and place it on the laboratory bench with the letters L and H at the top. Peel off the plastic cover and retain. Inspect the tray to insure it meets the criteria outlined in the Storage and Shelf Life Section. Record the specimen code on the frosted portion of the tray.

- 1) Remove the appropriate strip from the pouch and place it in the strip holder by sliding the strip under the retaining clip. Then press down to snap the top of the strip into place. (Fig. 1)
- 2) Snap the strip holder into place on the UniScept tray by pressing the connectors on the strip holder into the two receptacles on the UniScept tray. A snap fit indicates that the strip holder is properly joined. (Fig. 2)
- 3) Inoculate as described.
- 4) Dispense 5-10 ml of tap water into the strip holder to provide a humid atmosphere for incubation. A plastic squeeze bottle may be used. (Fig. 3)

**NOTE: CARE SHOULD BE USED WHEN HANDLING THE ASSEMBLED UNISCEPT KB PLUS SYSTEM.**

bioMérieux Vitek, and UniScept are Registered Trademarks of bioMérieux, Vitek, Inc. and/or bioMérieux SA (France).

MultiELECTRAPETTE is a Registered Trademark of Matrix Technologies Corporation



COMBO PLATE SYSTEM

Fig 1 Place Strip into holder

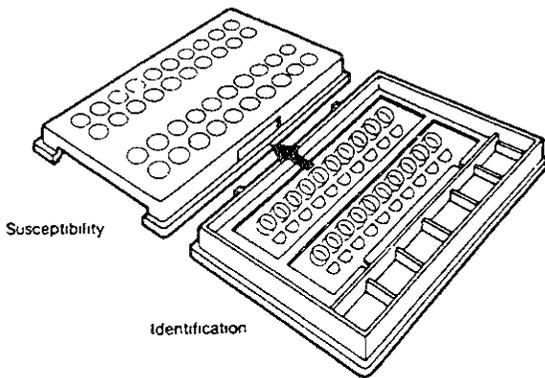


Fig 2 Tray and Strip holder connecting

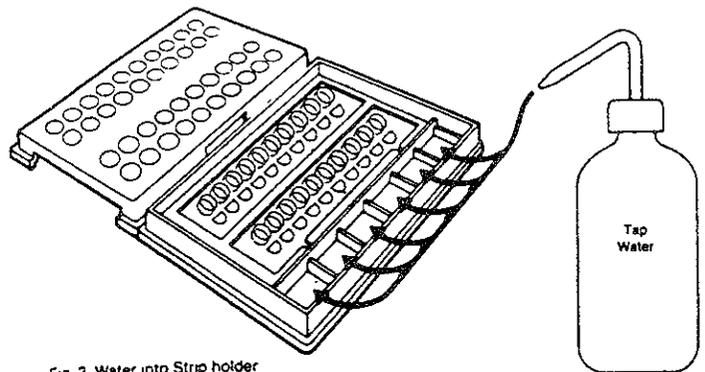


Fig 3 Water into Strip holder