



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS
CULTIVABLES OBTENIDOS A PARTIR DE SUPERFICIES
DE LAS LÍNEAS 1 Y 7 DEL METRO DE LA CDMX**

T E S I S

QUE PRESENTA

LETICIA ORTEGA SALAS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

ASESORA

MARIANA PEIMBERT TORRES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: BONILLA ESPINOSA EDUARDO

VOCAL: PEREA MEJIA LUIS MANUEL

SECRETARIO: PEIMBERT TORRES MARIANA

1er. SUPLENTE: GARZA AGUILAR SARA MARGARITA

2° SUPLENTE: GARCIA VELAZQUEZ LIZBETH ESMERALDA

Trabajo realizado en el laboratorio de Biofisiocoquímica, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa.

Asesora del tema: Dra. Mariana Peimbert Torres _____

Sustentante: Leticia Ortega Salas _____

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 La Zona Metropolitana del Valle de México y su movilización urbana	2
2.1.1 Generalidades de la Zona Metropolitana del Valle de México	2
2.1.2 Sistema de Transporte Colectivo Metro de la Ciudad de México	3
2.1.3 Características de la línea rosa (Observatorio – Pantitlán)	5
2.1.4 Características de la línea naranja (El Rosario – Barranca del muerto)	5
2.2 El microbioma	6
2.2.1 El microbioma humano	6
2.2.2 El microbioma urbano	7
2.2.3 El microbioma de superficies en interiores	8
2.2.4 Características microbiológicas en medios de transporte subterráneos de diversas partes del mundo	10
2.2.5 Antecedentes microbiológicos en el STC Metro de la CDMX	14
2.3 Medios de cultivo	15
2.4 Determinación de presencia microbiana	18
2.4.1 Técnicas dependientes de cultivo	18
2.4.2 Técnicas independientes de cultivo	18
2.5 Caracterización microbiana	19
2.5.1 Métodos fenotípicos, fisiológicos y bioquímicos	19
2.5.2 Métodos moleculares	20
2.5.3 Taxonomía polifásica	21
2.6 El ribosoma	22
2.6.1 Estructura y función	22
2.6.2 Secuenciación del ARN ribosomal	23
2.6.3 ARN ribosomal 16S (ARNr 16S)	23
2.6.4 Espaciadores Transcritos Internos (ITS)	25
2.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	26
2.8 Secuenciación de ADN	28
2.8.1 Método de Sanger	29
2.9 El género <i>Lactobacillus</i> y su importancia	30
3. JUSTIFICACIÓN	32

4. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo general	33
4.2 Objetivos particulares	33
5. MATERIAL Y MÉTODOS	34
5.1 Toma de muestras	34
5.2 Cultivo	34
5.3 Análisis macroscópico	35
5.4 Extracción de ADN genómico	35
5.5 Amplificación de ADN mediante PCR	35
5.6 Purificación de productos de PCR	37
5.7 Análisis de productos de PCR purificados	37
5.8 Secuenciación	38
5.9 Identificación microbiana	38
5.10 Análisis estadístico	38
6. RESULTADOS	39
6.1 Metadatos registrados durante el muestreo	39
6.2 Determinación de UFC/300 cm ² en los medios de cultivo general y MRS	42
6.3 Descripción morfológica de las UFC encontradas en medio MRS	43
6.4 Amplificación de ADN mediante PCR	44
6.5 Purificación de productos de PCR	45
6.6 Secuenciación	46
6.7 Tipos de microorganismos encontrados	47
6.8 Identificación y abundancia relativa de microorganismos	48
7. DISCUSIÓN	50
7.1 Factores ambientales	51
7.2 Comunidades microbianas en superficies del Metro	53
7.3 Identificación microbiana en subterráneos	55
7.4 Bacterias identificadas en superficies del Metro de la CDMX	57
7.5 Hongos identificados en superficies del Metro de la CDMX	58
7.6 Presencia microbiana en el Metro de la CDMX	60
7.7 Comparación entre los estudios realizados en el Metro de la CDMX	63
8. CONCLUSIONES	65
9. REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

Pág.

FIGURAS

1. Delimitación actual de la ZMVM	2
2. Mapa del Sistema de Transporte Colectivo Metro	4
3. Estaciones de la línea rosa del STCM de la CDMX	5
4. Estaciones de la línea naranja del STCM de la CDMX	6
5. Comparación entre los componentes ribosomales de procariotas y eucariotas	23
6. Regiones conservadas e hipervariables del ARNr 16S	25
7. Ensamblaje de los ARNr en las subunidades del ribosoma en eucariotas	26
8. Presentación esquemática de la PCR	28
9. Adición de nucleótidos trifosfatados por la ADN polimerasa	29
10. Electroforesis en gel de agarosa 1%	45
11. Electroferograma obtenido mediante la secuenciación de una muestra de ADN empleando el método de Sanger	46

TABLAS

1. Comparación de estudios microbiológicos realizados en sistemas de transporte subterráneo de diversas partes mundo	11
2. Secuencias de los cebadores utilizados	36
3. Condiciones para la PCR	36
4. Especificaciones de llenado de pozos de microplaca para secuenciación	37
5. Número de pasajeros, temperatura y porcentaje de humedad relativa registrados durante el muestreo en los vagones y pasamanos de las líneas rosa y naranja	39
6. Descripciones de morfologías encontradas en medio MRS (35° C, 7 días)	44
7. Enfermedades asociadas a los microorganismos cultivables encontrados en superficies del Metro de la CDMX	60

GRÁFICOS

1. UFC totales vs temperatura registrada durante el muestreo	40
2. UFC totales vs % humedad relativa registrada durante el muestreo	41
3. UFC totales vs número de pasajeros presentes durante el muestreo	41
4. UFC obtenidas en medio general a partir de superficies de las líneas rosa y naranja	42

5. UFC obtenidas en medio MRS a partir de superficies de las líneas rosa y naranja	43
6. Espectro de absorción de producto de PCR purificado	45
7. Comparación entre bacterias y hongos obtenidos en medio MRS a partir de las líneas rosa y naranja	47
8. Abundancia relativa de los microorganismos identificados en vagones y pasamanos del metro	48
9. Identificación microbiana en línea rosa	49
10. Identificación microbiana en línea naranja	49

1) RESUMEN

Los sistemas de transporte público son ideales para estudiar el microbioma urbano y la transferencia interindividual de las comunidades microbianas. Particularmente, los sistemas de transporte subterráneos son ambientes confinados con presencia de microorganismos muy variados y elevado flujo de personas, por lo que son espacios relevantes en el ámbito de la salud pública. A pesar de esto se tiene muy poca información microbiológica en dichos sistemas de transporte.

En este estudio se realizó la identificación de microorganismos cultivables en medio de cultivo ácido, obtenidos a partir de muestras superficiales del Sistema de Transporte Colectivo Metro de la Ciudad de México, empleando técnicas de identificación molecular.

El principal determinante de la presencia microbiana en superficies del Metro fue la ocupación humana, mientras que los factores ambientales como la temperatura y el porcentaje de humedad relativa no tuvieron un efecto claro sobre la cantidad de microorganismos encontrados.

Se identificaron microorganismos asociados a la piel humana como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* y *Candida parapsilosis*; y microorganismos asociados a suelos: *Rhodotorula mucilaginosa*.

Los resultados aquí presentados sugieren que las comunidades microbianas capaces de crecer en medio de cultivo ácido son en su mayoría derivados de la piel humana o pueden ser arrastrados desde el exterior por las personas.

Todos los microorganismos encontrados en superficies del Metro presentan un potencial patogénico, sin embargo, se requieren más estudios al respecto para determinar el peligro que representan para los usuarios de este medio de transporte.

2) INTRODUCCIÓN

➤ 2.1 La Zona Metropolitana del Valle de México y su movilización urbana

2.1.1 Generalidades de la Zona Metropolitana del Valle de México

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) está conformada por la Ciudad de México (CDMX), 58 municipios conurbados del Estado de México y un municipio conurbado del Estado de Hidalgo [1] (figura 1). De acuerdo al Censo General de Población y Vivienda 2015 elaborado por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) hasta dicho año la ZMVM albergaba aproximadamente a 21 millones de habitantes, es decir, cerca del 20% de la población total mexicana [2].

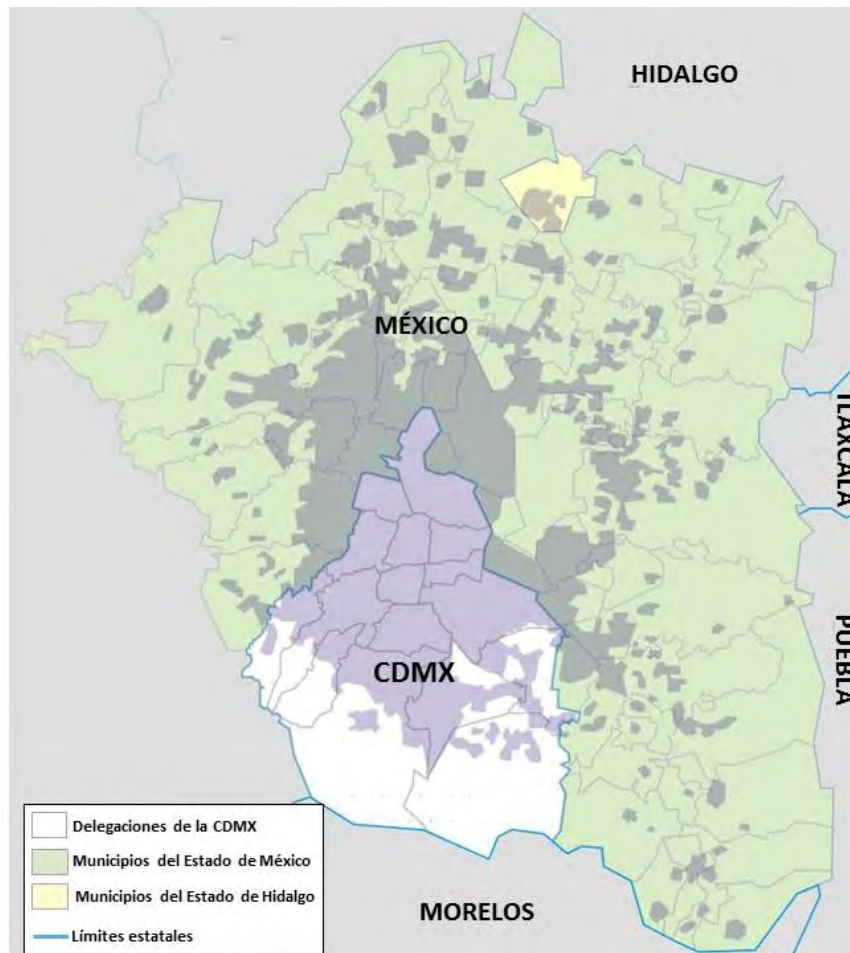


Figura 1. Delimitación actual de la ZMVM.

Adaptada de “Zona Metropolitana del Valle de México”, Wikipedia
(https://es.wikipedia.org/wiki/Zona_metropolitana_del_valle_de_México).

Con base en el Reporte Nacional de Movilidad Urbana en México 2014-2015, se estima que en la ZMVM el 78.5% de la población realiza sus desplazamientos cotidianos en transporte público colectivo (microbús, combis, autobús suburbano y taxi), transporte público masivo (Metro, Metrobús, Tren ligero, Tren suburbano y Trolebús), bicicleta, motocicleta y a pie; mientras que sólo el 21.5% utiliza automóvil particular [3,4]. De los viajes que se realizan en transporte público, el 8.2% se efectúan en el Sistema de Transporte Colectivo Metro (STCM), lo que lo convierte en el principal medio de transporte en la CDMX [4].

2.1.2 Sistema de Transporte Colectivo Metro de la Ciudad de México

El Metro es un sistema de transporte público basado en la operación de trenes impulsados con energía eléctrica a través de líneas subterráneas, superficiales y elevadas; y cuya función es la movilización masiva de personas en la CDMX y parte de su zona conurbada (figura 2). Es considerada la infraestructura más importante con la que cuenta el Gobierno de la CDMX para afrontar la demanda de servicios de transporte [2,5].

La característica principal del Metro es que se encuentra en un proceso de evolución constante mediante la incorporación de nuevas tecnologías y la ampliación de la red. Actualmente cuenta con un total de 226.5 kilómetros, 12 líneas, 195 estaciones, 390 trenes en operación, 10 talleres de mantenimiento y 15,000 trabajadores aproximadamente [5,6].

Este medio de transporte traslada a más de mil 600 millones de personas anualmente, razón por la cual desde su inauguración el 4 de Septiembre de 1967 se convirtió en uno de los principales espacios públicos y de convivencia para los habitantes de la CDMX. Cerca de 4.3 millones de personas utilizan el Metro diariamente, cuyo tiempo promedio de viaje es de 2 horas al día [5,6].

El acceso al Metro de la CDMX tiene un costo de \$5° y brinda sus servicios los 365 días del año en los siguientes horarios:

- Días laborales de 5:00 a 24:00 horas.
- Sábados de 6:00 a 24:00 horas.
- Domingos y días festivos de 7:00 a 24:00 horas.

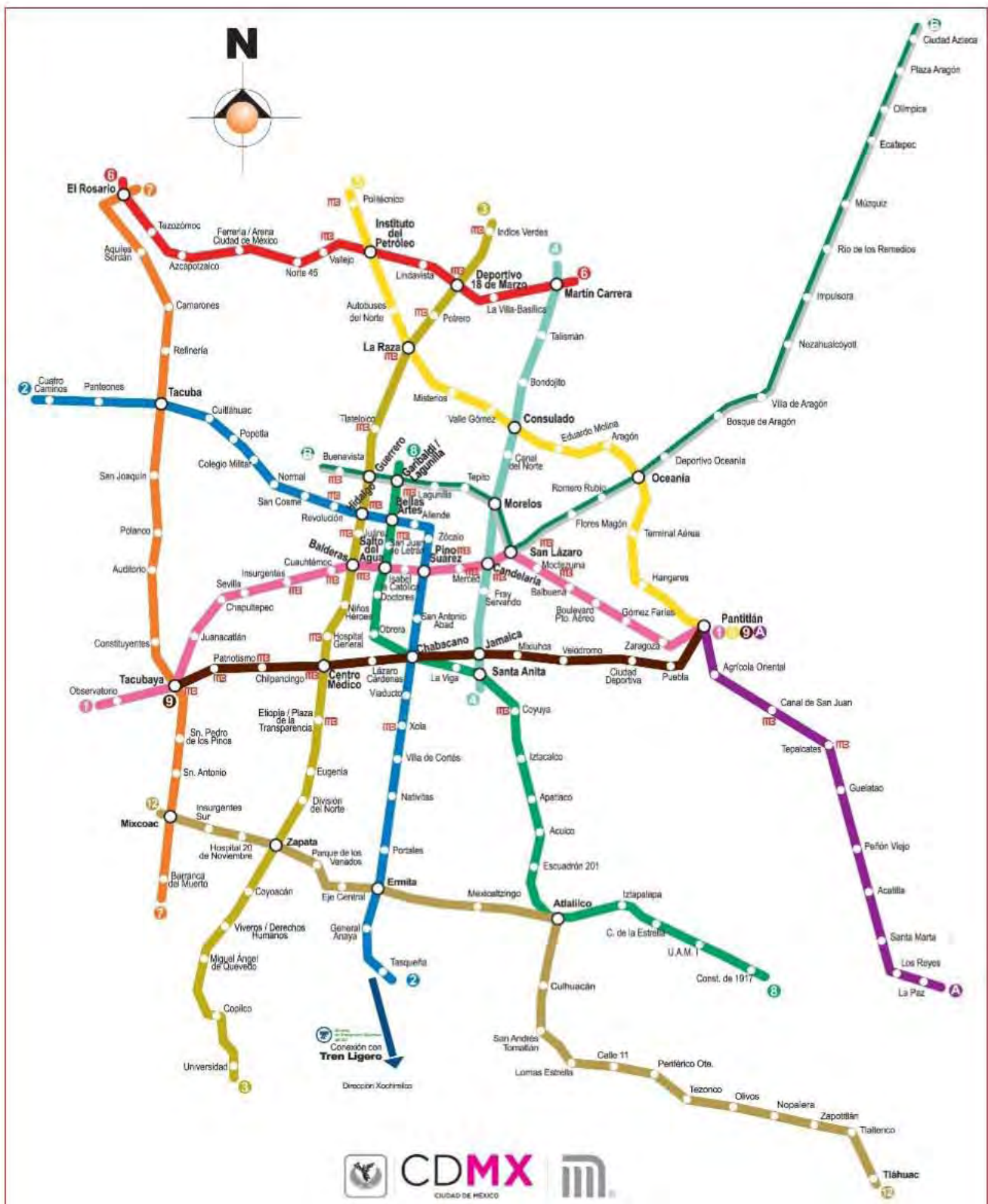


Figura 2. Mapa del Sistema de Transporte Colectivo Metro.
Red de Metro de la CDMX (<http://www.metro.cdmx.gob.mx>).

2.1.3 Características de la línea rosa (Observatorio – Pantitlán)

La línea 1 (rosa) del Metro (figura 3) está conformada por 20 estaciones, de las cuales 7 son de correspondencia (incluida una de sus terminales), 12 de paso y una terminal más; del total, una estación es superficial y 19 son subterráneas. Se localiza al centro de la CDMX con dirección poniente – oriente. Tiene una longitud total de 18.828 km, de los cuales 16.654 km son usados para el servicio de pasajeros y el resto para maniobras. Es la segunda línea con mayor afluencia en la red al transportar en promedio en un día laborable del 2016 a 676,221 personas. Esta línea se realizó durante la primera etapa de construcción del STCM, que abarcó el periodo de 1967 a 1972 [5,6].



Figura 3. Estaciones de la línea rosa del STCM de la CDMX.

Red de Metro de la CDMX (<http://www.metro.cdmx.gob.mx/>).

2.1.4 Características de la línea naranja (El Rosario – Barranca del muerto)

La línea 7 (naranja) del STCM (figura 4) se compone por 14 estaciones, de las cuales 4 son de correspondencia (incluida una de sus terminales), 9 son de paso y una terminal más. Del total, una estación es superficial y 13 son subterráneas. Tiene una longitud de 18.784 km, de los cuales 17.011 km se usan para el servicio de pasajeros y el resto para maniobras. Se ubica al poniente de la CDMX con dirección norte – sur. Es una de las líneas que presentan la menor afluencia en la red, en un día laborable del 2016 movilizó en promedio a 265,895 personas. Se realizó durante la tercera etapa de construcción de la red (1983 – 1985) [5,6].



Figura 4. Estaciones de la línea naranja del STCM de la CDMX.
Red de Metro de la CDMX (<http://www.metro.cdmx.gob.mx/>).

➤ 2.2 El microbioma

2.2.1 El microbioma humano

El término "microbioma" representa la diversidad de microorganismos presentes en un hábitat [7], por lo tanto, al hablar del "microbioma humano" se hace referencia a la colección de todos los microorganismos que viven en asociación con el cuerpo humano. Estas comunidades consisten en una variedad de microorganismos que incluyen procariontes, eucariotes y virus [8].

En años recientes se ha demostrado que el cuerpo humano no es tan autosuficiente como se creía [9]. Las personas albergan comunidades microbianas complejas que habitan tanto cavidades como superficies corporales. El número de células bacterianas en un cuerpo humano es en promedio diez veces mayor que el de las células humanas. Estos microbios aparentemente no son dañinos para las personas, de hecho, son indispensables para mantener la salud mediante diversos procesos [8,10].

Las comunidades de microorganismos y los genes que estas incluyen, otorgan ayuda vital en algunos procesos biológicos básicos como la síntesis de moléculas necesarias, la descomposición del alimento para extraer los nutrientes, la maduración del sistema

inmunológico para reconocer a los invasores peligrosos y la producción de compuestos para combatir patógenos [8,11].

Los estudios sobre el microbioma humano han producido numerosos hallazgos. Cuando los investigadores completaron el análisis del Proyecto del Genoma Humano (HGP, por sus siglas en inglés) en Abril del 2003, se confirmó que la información genética es 99.9% idéntica entre los individuos de todo el mundo, no obstante, es probable que la salud y tal vez, algunas de las acciones de las personas, pueden estar mucho más relacionadas con la variación en los genes del microbioma que con los del propio organismo [9,11].

Entre individuos existen variaciones importantes en la cantidad y diversidad de las especies presentes en sus respectivos microbiomas, sin embargo, la mayoría de los humanos comparten un conjunto básico de genes procedentes de ciertas especies bacterianas. Los tipos de organismos presentes en cada parte del cuerpo son altamente dependientes de las condiciones del microambiente y de los diferentes factores del huésped y por lo tanto, varían entre los distintos sitios anatómicos [9,10]. Actualmente se reconoce que la variación interindividual en el microbioma es específica, funcionalmente relevante y personalizada; aunque mucha de esta diversidad sigue sin entenderse, se han relacionado diversos factores como el ambiente, la exposición microbiana temprana, la dieta y la genética del huésped [11].

2.2.2 El microbioma urbano

Los microorganismos son la base de cualquier forma de vida, incluyendo la humana, de modo que las interacciones hombre – microorganismos (directas e indirectas) ocurren de forma cotidiana en ambientes urbanos. De manera natural, los microorganismos se encuentran en comunidades complejas (o microbiomas), y es en este contexto donde surge su importancia porque ejercen papeles importantes sobre las actividades y funciones tanto de huéspedes como de los sistemas que habitan [7].

Los microbiomas urbanos incluyen comunidades microbianas tanto en espacios abiertos como cerrados ya que los microorganismos se encuentran en asociaciones con todo tipo de superficies, tanto terrestres como acuáticas; así como con animales, plantas y humanos. De

manera general, los microbiomas urbanos pueden definirse como extensos y diversos conjuntos de microbios transitorios y residentes, que existen sobre o dentro de los innumerables hábitats bióticos y abióticos que componen los sistemas urbanos. Estas comunidades microbianas y los efectos que ejercen sobre los seres humanos pueden ser modificadas por perturbaciones naturales y antropogénicas [7,12].

Se sabe muy poco sobre la composición y la dinámica de los microbiomas urbanos, pero es evidente que desempeñan funciones básicas que permiten o facilitan la vida urbana [7,12]. Entre otras cosas, los microorganismos están involucrados en los ciclos de diversos elementos químicos indispensables para la vida (carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo), que aunque pueden ser abundantes en la naturaleza a veces no están disponibles en formas que puedan ser utilizados por animales y plantas a menos que sean biotransformados. Los microbios también son ampliamente utilizados en diversos procesos como el tratamiento de aguas y degradación de diversos contaminantes (biorremediación) [7,13].

2.2.3 El microbioma de superficies en interiores

Actualmente una persona pasa en promedio el 90% de su vida en interiores [14] donde está en contacto constante con el microbioma del ambiente construido (comunidades microbianas de los espacios cerrados) [15]. Estos microbiomas son ecosistemas complejos que albergan billones de microorganismos que interactúan entre sí, con los seres humanos y con el entorno [16]. En interiores, una persona se encuentra con microorganismos en virtualmente cada superficie que toca, sin embargo, se sabe relativamente poco sobre la diversidad y la composición microbiana; las interacciones entre el microbioma humano y el microbioma del ambiente construido; y los procesos ecológicos que promueven la formación de comunidades microbianas en interiores [17,18].

Las comunidades microbianas difieren mucho entre los diferentes tipos de ambientes interiores [19]. Como para cualquier otro bioma, la composición del microbioma del ambiente construido es determinado por la combinación de dos procesos ecológicos simultáneos: la dispersión de microbios desde una fuente disponible y la selección de ciertos tipos microbianos por restricciones específicas del lugar [16,18].

Entre las restricciones ambientales que pueden influir en la diversidad y composición del microbioma se encuentran factores como el material, el tipo de superficies, la ventilación, la humedad relativa y la temperatura. Dichos factores pueden modificar las tasas de supervivencia y crecimiento de muchos microorganismos, así como su dispersión dentro del ambiente construido [16,20].

La ocupación humana es el factor más importante que afecta la cantidad y diversidad de los microbiomas presentes en interiores, principalmente en espacios mal ventilados o muy concurridos [19]. En promedio, un humano despiden aproximadamente 1.5 millones de células de la piel por hora, llevando con ellas aproximadamente 15 millones de partículas biológicas, contribuyendo de forma sustancial a la diversidad microbiana en interiores [21]. También la transferencia de la microbiota de la piel a través del contacto directo con superficies tiene un impacto considerable [22].

La forma en que los microorganismos asociados a humanos se difunden dentro del ambiente construido ocurre por dos mecanismos principales: emisión de bioaerosoles y contacto directo humano - superficie [23].

La piel humana es la fuente primaria de bacterias en superficies de espacios cerrados, aunque también se han encontrado bacterias asociadas a regiones gastrointestinales y urogenitales [22,24]. Muchos de los microorganismos asociados a la piel pueden persistir en las superficies por períodos prolongados porque en general son altamente resistentes al estrés ambiental como la desecación, la temperatura y la radiación UV [25].

Los seres humanos albergan distintos conjuntos microbianos en diferentes sitios anatómicos, así que la estructura del microbioma construido varía con la frecuencia y la naturaleza del contacto humano [18]. Las comunidades bacterianas asociadas con la piel son sorprendentemente diversas y con un alto grado de variabilidad interindividual, de manera que las personas pueden dejar “firmas bacterianas” indicativas de determinadas partes del cuerpo y tipos de contacto corporal [23,25].

La mayoría de los organismos identificados en superficies de interiores se relacionan con comensales humanos, lo que sugiere que los microbios no están creciendo activamente en las superficies, sino que son depositados de forma directa o indirecta por las personas [17]. Diversos estudios han identificado como phyla bacterianos dominantes en ambientes interiores a *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* [24].

2.2.4 Características microbiológicas en medios de transporte subterráneos de diversas partes del mundo

Los subterráneos son comunes a todas las ciudades grandes y cada día muchas personas pasan allí una parte significativa de su tiempo [32]. En comparación con otros ambientes interiores, el Metro ofrece un entorno único para estudiar la diversidad microbiana debido a la cantidad de personas que utiliza este medio de transporte. Cerca de 200 ciudades de todo el mundo tienen redes de subterráneos que son utilizadas por más de 100 millones de personas cada día, sin embargo, hay muy poca información publicada sobre las cargas microbianas en estos medios de transporte [37].

Debido a la falta de investigaciones aún no es claro si el subterráneo tiene una microbiota propia o una microbiota variable compuesta por microorganismos transportados por las personas [32]. Hasta el momento de escritura de esta tesis se tiene conocimiento de 21 trabajos publicados (tabla 1) respecto a características microbiológicas cualitativas y cuantitativas realizados en diversos sistemas de transporte subterráneos alrededor del mundo [26-46].

Tabla 1. Comparación de estudios microbiológicos realizados en sistemas de transporte subterráneo de diversas partes del mundo.

Lugar y Año	Estudio	Análisis	Técnica de identificación	Resultados	Concentración (UFC/m ³)	Ref.
Londres, Reino Unido 1998	A preliminary survey of aerial biocontaminants at six London underground stations	Bacterias y hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias Hongos Hongos principales: <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Scopulariopsis</i>	----- 150	[26]
Milán, Italia 2000	Airborne fungi as biocontaminants at two Milan underground stations	Hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Hongos principales: <i>Cladosporium</i> (33.2%) <i>Penicillium</i> (11.3%), <i>Epicoccum</i> (7.5%), <i>Aspergillus</i> (3.2%)		[27]
El Cairo, Egipto 2002	Environmental study in subway metro stations in Cairo, Egypt	Bacterias y hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias <i>Staphylococcus</i> Bacterias esporuladas Hongos <i>Candida</i> Actinomicetos Hongos principales: <i>Cladosporium</i> (31.7%), <i>Aspergillus</i> (26.8%), <i>Penicillium</i> (12.2%), Levaduras (12.2%)	2.94x10 ³ 1.94x10 ² 1.04x10 ³ 80 60 27	[28]
Washington D.C., EUA 2003	Aerosol characteristics in a subway environment	Bacterias aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias Bacterias identificadas: <i>Cupriavidus necator</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Acidovorax</i>	5.5x10 ³ -7.9x10 ⁵ (UFC/mL)	[29]
Tokio, Japón 2005	An evidential example of airborne bacteria in a crowded, underground public concourse in Tokyo	Bacterias aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias Bacterias principales: <i>Micrococcus</i> (31%) <i>Staphylococcus</i> (23%)	237 – 456	[30]
Seúl, Corea 2006	Temporal variation of airborne fungi concentrations and related factors in subway stations in Seoul, Korea	Hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Hongos Hongos principales: <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Mucor</i>	4.3x10 ⁵	[31]

Lugar y Año	Estudio	Análisis	Técnica de identificación	Resultados	Concentración (UFC/m ³)	Ref.
San Petersburgo, Rusia 2009	Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg underground railway system	Hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Hongos Hongos principales: <i>Acremonium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i>	45 – 864	[32]
Seúl, Corea 2010	Assessment of airborne environmental bacteria and related factors in 25 underground railway stations in Seoul, Korea	Bacterias aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias Bacterias Gram (-)	191 19	[33]
Tokio, Japón 2010	Distribution and identification of airborne fungi in railway stations in Tokyo, Japan	Hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias Hongos Hongos principales: Hongos no esporulados (62.6%), <i>Aspergillus</i> (16.1%), <i>Cladosporium</i> (16.0%), <i>Penicillium</i> (4.9%)	118 – 246 64 – 117	[34]
Beijing, China 2010	Exposure assessment in Beijing, China: biological agents, ultrafine particles, and lead	Bacterias y hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias Hongos	1.2x10 ⁴ 1.8x10 ³	[35]
Seúl, Corea 2011	Exposure level and distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in Seoul metropolitan subway stations	Bacterias y hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias principales: <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> Hongos principales: <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Chrysosporium</i> , <i>Aspergillus</i>		[36]
Oslo, Noruega 2012	Characterization of airborne bacteria at an underground subway station	Bacterias aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias Bacterias esporuladas 3 phyla principales: <i>Actinobacteria</i> (48%), <i>Firmicutes</i> (43%), <i>Proteobacteria</i> (9%) Bacterias principales: <i>Micrococcus</i> (32%), <i>Staphylococcus</i> (20%), <i>Bacillus</i> (18%), <i>Pseudomonas</i> (4%)	392 – 403 7 – 17	[37]
Teherán, Irán 2012	Concentration and distribution characteristics of airborne fungi in indoor and outdoor air of Tehran subway stations	Hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Hongos Hongos principales: <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i>	387 – 766	[38]

Lugar y Año	Estudio	Análisis	Técnica de identificación	Resultados	Concentración (UFC/m ³)	Ref.
Nueva York, EUA 2013	Culture-independent analysis of aerosol microbiology in a metropolitan subway system	Bacterias y hongos aerotransportables	Independiente de cultivo	4 phyla principales: <i>Proteobacteria</i> (26.6%), <i>Fungi</i> (26.4%), <i>Actinobacteria</i> (21.9%), <i>Firmicutes</i> (14.3%)		[39]
Hong Kong, China 2014	Indoor-air microbiome in an urban subway network: diversity and dynamics	Bacterias aerotransportables	Independiente de cultivo	4 phyla principales: <i>Proteobacteria</i> (23.4%), <i>Actinobacteria</i> (15.6%), <i>Firmicutes</i> (6.3%), <i>Deinococcus-Thermus</i> (1.6%) Bacterias principales: <i>Micrococcus</i> (4.9%), <i>Enhydrobacter</i> (3.1%), <i>Propionibacterium</i> (2.9%), <i>Staphylococcus</i> (1.8%), <i>Corynebacterium</i> (1.5%)		[40]
Oslo, Noruega 2014	Temporal variability of the bioaerosol background at a subway station: concentration level, size distribution, and diversity of airborne bacteria	Bacterias aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias 4 phyla principales: <i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> Bacterias principales: <i>Micrococcus</i> (37%), <i>Rhodococcus</i> (14%), <i>Arthrobacter</i> (11%), <i>Moraxella</i> (9%), <i>Staphylococcus</i> (6%)	98 – 819	[41]
CDMX, México 2014	Aerobiological study in the Mexico City subway system	Bacterias y hongos aerotransportables	Dependiente de cultivo	Bacterias principales: <i>Bacillus</i> (85%), <i>Streptococcus</i> (15%) Hongos principales: <i>Aspergillus</i> (47%), <i>Penicillium</i> (30%), <i>Alternaria</i> (23%)	1 – 484 51 – 715	[42]
Nueva York, EUA 2015	Geospatial resolution of human and bacterial diversity with city-scale metagenomics	Microorganismos en superficies	Independiente de cultivo	Especies más abundantes: <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Acinetobacter radioresistens</i> , <i>Acinetobacter nosocomialis</i> ,		[43]
Barcelona, España 2016	Bioaerosols in the Barcelona subway system	Bacterias aerotransportables	Independiente de cultivo	Bacterias frecuentes y con elevada proporción: <i>Methylobacterium</i> , <i>Chitinophagaceae</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Shingomonas</i>	4.5x10 ³	[44]
Boston, EUA 2016	Urban transit system microbial communities differ by surface type and interaction with humans and the environment	Microorganismos en superficies	Independiente de cultivo	4 phyla principales: <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> Bacterias principales: <i>Staphylococcaceae</i> , <i>Corynebacteraceae</i> , <i>Micrococcaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Pseudomonadaceae</i>		[45]

* En la tabla no se muestra el trabajo realizado en Hungría (Szam L., 1980) [46] por encontrarse en Alemán.

Los resultados reportados en dichos estudios son variados e incluso contradictorios debido al empleo de diversas técnicas de análisis. Sólo 5 estudios utilizaron técnicas de identificación microbiana independiente de cultivo [39,40,43-45], mientras que todos los demás se basan en técnicas dependientes de cultivo [26-38,41,42]. Es probable que los estudios que se centren en técnicas dependientes de cultivo (véase el punto 2.4.1) identifiquen sólo una pequeña fracción del contenido microbiano real porque la mayoría de los microorganismos no son cultivables por técnicas estándar de laboratorio [39]. Además, sólo los trabajos realizados por Afshinneko y cols. [43] y Hsu y cols. [45] se enfocaron en el análisis de muestras superficiales, mientras que todos los demás partieron de muestras aerotransportables [26-42, 44].

En general, en dichos trabajos se concluye que los sistemas subterráneos presentan condiciones microclimáticas bastante constantes y estaciones que a menudo están superpobladas por personas. Además, se considera que los sistemas de ventilación, la humedad, la temperatura, la densidad de población y las actividades humanas son los principales factores que modifican la diversidad y la cantidad de biocontaminantes en estos sistemas de transporte [26-45].

2.2.5 Antecedentes microbiológicos en el STC Metro de la CDMX

El único trabajo realizado hasta el momento respecto a las características microbiológicas dentro del STCM de la CDMX, es el realizado por Hernández y cols. [42] en donde se trató de identificar y cuantificar a los diferentes microorganismos presentes dentro de dicho medio de transporte, así como la determinación de las condiciones ambientales que pudieran modificar la cantidad de microbios.

Para lograr los objetivos planteados, los investigadores partieron de muestras aerotransportables y desarrollaron un protocolo de identificación microbiana dependiente de cultivo en donde analizaron las características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas presentadas por los microorganismos aislados.

En dicho estudio se encontró lo siguiente:

- La concentración de bacterias aerotransportables cultivables (UFC/m³) se correlaciona positivamente con la temperatura del lugar muestreado.
- La concentración de hongos aerotransportables cultivables (UFC/m³) se correlaciona negativamente con la temperatura del lugar muestreado.
- La temperatura se correlaciona positivamente con la profundidad, la mala ventilación y el número de personas.
- La temperatura dentro del STCM de la CDMX depende de la estación del año.
- Las personas son un importante vector de microorganismos aerotransportables en espacios cerrados.
- Las concentraciones de hongos y bacterias aerotransportables son hasta 8 veces más altas en el interior del Metro que en el exterior.
- La mayor parte de las bacterias cultivables encontradas pertenecen al género *Bacillus* (85%) mientras que el 15% restante son estreptococos.
- Los hongos cultivables más predominantes pertenecen al género *Aspergillus* (47%), mientras que *Penicillium* y *Alternaria* se encuentran en menor proporción (30% y 23% respectivamente).
- La fracción respirable (partículas < 5 µm) de hongos es mayor (57-91%) que la fracción respirable de bacterias (45%).
- La calidad del aire dentro del Metro de la CDMX es peor que en exteriores.
- Es necesario el establecimiento de estándares mexicanos para determinar el riesgo a la salud por exposición a partículas aerotransportables en espacios cerrados.

Para el estudio del microbioma se emplean técnicas de identificación microbianas tanto dependientes como independientes de cultivo. A continuación se señalan los aspectos más importantes de cada una.

➤ 2.3 Medios de cultivo

El proceso de cultivar microorganismos implica la obtención de una muestra y su inoculación en un medio tal, que permita su crecimiento en el entorno artificial del laboratorio. Cuando se

habla de crecimiento microbiano se hace referencia al número de células no al tamaño de éstas. Los microbios que están creciendo están aumentando en número, acumulándose en colonias o grupos de células (de miles o miles de millones) lo suficientemente grandes para ser observados a simple vista [13,47].

Los requisitos para el crecimiento microbiano se pueden dividir en dos categorías principales: requisitos físicos y requisitos químicos. Los aspectos físicos incluyen temperatura, pH y presión osmótica; mientras que los químicos incluyen fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, oxígeno, oligoelementos y factores de crecimiento orgánicos [13].

Al comprender las condiciones necesarias para el crecimiento microbiano, es posible controlar la reproducción de los microorganismos [13]. Aunque las condiciones de crecimiento pueden ser satisfechas para muchos microorganismos, las necesidades de otros no se conocen lo suficiente como para permitir su desarrollo en condiciones de crecimiento *in vitro*. Los microorganismos presentan diversas necesidades nutricionales por lo que existen diferentes medios de cultivo [47].

Los medios de cultivo pueden usarse en dos fases: líquida (caldo) o sólida (agar). En algunos casos pueden presentarse de forma bifásica (líquido/sólido). En los caldos los nutrientes del medio están disueltos en agua, mientras que en la forma sólida se encuentra una combinación de nutrientes, agua y agente solidificante (generalmente agar) [47].

Los medios de cultivo se pueden clasificar de diversas formas:

a) De acuerdo a su formulación

Medio químicamente definido: Para favorecer el crecimiento microbiano, un medio debe proporcionar una fuente de energía, así como fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y cualquier factor de crecimiento orgánico que el organismo no pueda sintetizar. Un medio químicamente definido es aquel cuya composición química exacta se conoce [47].

Medio complejo: Los medios complejos se realizan a partir de nutrientes como extractos de levaduras, carne o plantas; por lo que la composición química exacta varía ligeramente de lote a lote [47].

b) De acuerdo a su uso

Medio general o nutritivo: Contienen nutrientes que impulsan el crecimiento de la mayoría de los organismos que no son nutricionalmente exigentes sin dar a ningún organismo particular una ventaja de crecimiento [13,47].

Medio selectivo: Contienen uno o más agentes que son inhibidores para todos los organismos, excepto para aquellos seleccionados por las condiciones químicas o de crecimiento. Por lo que están diseñados para suprimir el crecimiento de microorganismos no deseados y estimular el crecimiento de los deseados [13,47].

Medio diferencial: Emplean algún factor (o factores) que permite(n) que las colonias de una especie o tipo bacteriano exhiban ciertas características metabólicas o de cultivo que pueden usarse para distinguirla de otras bacterias que crecen en el mismo medio. Facilitan la distinción entre microorganismos [13,47].

Medio de enriquecimiento: Contienen nutrientes específicos requeridos para el crecimiento de microorganismos particulares que pueden estar solos o con otras especies en una muestra dada. Se utilizan para aumentar el crecimiento de un microorganismo específico a partir de una mezcla de organismos, sin dejar a los demás en desventaja [13,47].

Medios combinados: Muchos medios proporcionan más de una función, por ejemplo, existen medios que son selectivos y diferenciales a la vez [13,47].

➤ 2.4 Determinación de presencia microbiana

2.4.1 Técnicas dependientes de cultivo

El cultivo, cuando es factible, continúa siendo un método ampliamente utilizado porque es una técnica sensible, permite el aislamiento de microorganismos, posibilita la identificación de muchas especies diferentes, ayuda en estudios de sensibilidad antimicrobiana, facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos y permite realizar el conteo de células viables en una muestra [48,49].

Las técnicas dependientes de cultivo presentan algunos inconvenientes, como baja reproducibilidad, la selección de ciertas especies debido a los medios de cultivo elegidos, y el hecho de que no pueden detectarse los microorganismos muertos [48]. Además, pueden fallar en aislar o detectar un gran número de microorganismos con requerimientos nutricionales especiales. Existen microorganismos que no han podido ser cultivados debido a la falta de características fenotípicas para la especie, concentraciones relativamente bajas en la muestra o selección de medio de cultivo y/o condiciones de incubación inapropiados [50,51]; generalmente < 1% de las bacterias ambientales son cultivables por métodos estándar de laboratorio [52].

A pesar de sus limitaciones, las técnicas dependientes de cultivo siguen siendo una parte importante de los estudios microbiológicos y se usan a menudo junto con otros métodos que proporcionan una descripción más completa de la muestra [50].

2.4.2 Técnicas independientes de cultivo

Las técnicas de identificación independientes de cultivo pueden mostrar una mayor diversidad microbiana porque se evitan los problemas inherentes al cultivo y permiten la identificación de organismos de difícil cultivo [50]. Estos métodos enumeran los organismos sin tener en cuenta la viabilidad [48].

➤ 2.5 Caracterización microbiana

A continuación se presentan las principales características de algunos de los métodos más frecuentemente utilizados para la identificación de microorganismos.

2.5.1 Métodos fenotípicos, fisiológicos y bioquímicos

Los esquemas tradicionales de identificación se basan en las características observables de los microorganismos como la morfología, el desarrollo y las propiedades bioquímicas metabólicas. El análisis inicial en la identificación microbiana a menudo implica uno o más métodos fenotípicos. Los métodos fenotípicos son adecuados para microorganismos que son cultivables y que presentan perfiles fisiológicos y bioquímicos bien establecidos [48,49].

a) Características morfológicas

Estos métodos utilizan la morfología para obtener una identificación preliminar de un microorganismo. Se parte del cultivo y observación macroscópica (colonias) y microscópica (células) de los microorganismos. Las propiedades morfológicas incluyen: forma, tamaño, presencia de pigmentos, características de la pared celular (tinción de Gram), esporulación, mecanismos de motilidad, entre otros [48].

b) Características fisiológicas y bioquímicas

Se basan en el estudio de los requerimientos de crecimiento, actividades enzimáticas y composición celular de ácidos grasos de los microorganismos. Las pruebas bioquímicas utilizan medios de crecimiento específicos que provocan una respuesta bioquímica observable o medible, permitiendo así la identificación y caracterización del microorganismo. Estas pruebas incluyen: utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, requerimientos de crecimiento (condiciones de oxígeno, temperatura y pH), osmolaridad, generación de productos de fermentación, síntesis de enzimas, síntesis de compuestos antimicrobianos, sensibilidad a inhibidores metabólicos y sensibilidad a antibióticos. Los microorganismos también se pueden

identificar analizando los perfiles de ácidos grasos de células enteras o membranas celulares [49-52].

La expresión de fenotipos microbianos es altamente dependiente de variables ambientales (pH del cultivo, temperatura, medios de cultivo, agotamiento de nutrientes, presencia de factores de estrés, etc.) y, por tanto, pueden introducir sesgos en el proceso de identificación [49].

Los métodos fenotípicos sólo son aceptables si los criterios de respuesta son suficientes para identificar el microorganismo con un alto nivel de confianza y permiten la distinción entre microorganismos filogenéticamente cercanos. A pesar de sus limitaciones, las técnicas fenotípicas proporcionan una identificación inicial que permite tomar decisiones posteriores [49,51].

2.5.2 Métodos moleculares

El desarrollo de métodos moleculares ha mejorado mucho la capacidad de detectar, identificar y clasificar rápidamente microorganismos. También permiten establecer la relación taxonómica entre microorganismos estrechamente relacionados. Las técnicas moleculares pueden usarse tanto en microorganismos cultivables como no cultivables [48,49].

La identificación utilizando métodos moleculares, se basa en la comparación de las secuencias de ácidos nucleicos (ADN, ARN) o perfiles proteicos de un microorganismo, contra la información documentada sobre organismos conocidos. Los métodos moleculares se consideran lo suficientemente sensibles como para permitir la detección de bajas concentraciones de microorganismos viables o no viables en cultivos puros y muestras complejas [48].

a) Métodos basados en ácidos nucleicos

Los métodos basados en ácidos nucleicos incluyen técnicas como la hibridación de ácidos nucleicos y técnicas basadas en amplificación o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas últimas involucran, entre otras, comparaciones de secuencias de regiones genómicas

conservadas, comparaciones de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o comparaciones de contenido de %G+C en el ADN genómico con datos correspondientes sobre microorganismos conocidos [48,50].

b) Métodos basados en proteínas

Los métodos basados en proteínas involucran técnicas como Western blot o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar proteínas específicas que son únicas y/o características de un microorganismo. Los métodos basados en proteínas también incluyen electroforesis en gel (SDS-PAGE, geles 2D, etc.) que pueden separar proteínas celulares para compararlas con perfiles proteicos de microorganismos conocidos [48].

c) Genómica

Más recientemente, se han utilizado perfiles completos del transcriptoma, genoma, proteoma o metaboloma para identificar y caracterizar organismos [48].

En la identificación y caracterización de microorganismos se utilizan cada vez más tecnologías como el análisis de microarreglos de ADN, análisis de espectrometría de masas de proteínas o análisis de espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), entre otros [48].

2.5.3 Taxonomía polifásica

Se conoce como taxonomía polifásica a la integración de datos fenotípicos y genotípicos para la identificación microbiana. La elección de los métodos para la identificación microbiana es decisión de cada investigador, sin embargo, a veces se recomienda que se adopte un enfoque polifásico que incluya análisis microbiológicos y fenotípicos junto con herramientas moleculares para identificar con precisión a los microorganismos [49,50].

Dentro de los métodos moleculares basados en ácidos nucleicos la selección del gen o región génica para la identificación microbiana debe elegirse con cuidado. La comparación de secuencias de regiones conservadas del ARNr (ARN ribosomal) han sido ampliamente

utilizadas para la identificación tanto de procariotas como de eucariotas debido a su especificidad y sensibilidad [52].

➤ 2.6 El ribosoma

2.6.1 Estructura y función

Los ribosomas son complejos macromoleculares riboproteicos altamente especializados que utilizan los organismos para el proceso de síntesis de proteínas, por lo que se encuentran presentes en todas las células [53]. Los ribosomas están formados por dos subunidades, una grande y otra pequeña, las cuales se encuentran en un equilibrio de asociación \rightleftharpoons disociación [54,55].

Los ribosomas se encuentran presentes en los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eukarya) y aunque presentan algunas diferencias estructurales entre sí, la función se ha conservado a lo largo de la evolución por su importancia en el mantenimiento y crecimiento celular [56].

Una célula bacteriana contiene unos 10 mil ribosomas y una célula eucariótica contiene muchos más [54]. Los ribosomas procarióticos difieren de los ribosomas eucarióticos en el número de proteínas y moléculas de ARNr que contienen; son también algo más pequeños y menos densos que los ribosomas de las células eucariotas [13]. Las diferencias específicas de los ribosomas se resumen en la figura 5.

El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg). Está formado por la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S). La subunidad 50S está formada por una molécula de ARNr 23S, una de ARNr 5S y 31 proteínas ribosómicas. La subunidad 30S está conformada por una molécula de ARNr 16S y 21 proteínas [53,54].

En el ribosoma eucariótico se tiene una subunidad grande (60S) formada por una molécula de ARNr 25S/28S, una de ARNr 5.8S, una de ARNr 5S y 46 proteínas. En la subunidad pequeña

(40S) se encuentra un componente de ARNr 18S y 33 proteínas. Un ribosoma eucariótico ensamblado presenta un coeficiente de sedimentación de 80S [54,57]. Cabe mencionar que los cloroplastos y las mitocondrias contienen ribosomas 70S, lo que indica su evolución a partir de procariotas [13].

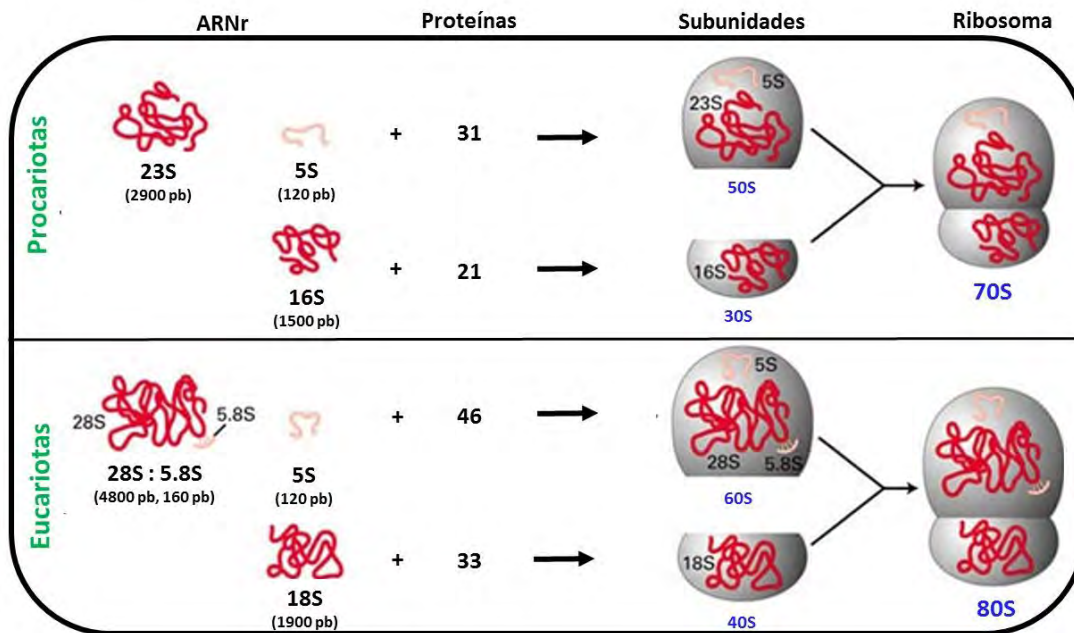


Figura 5. Comparación entre los componentes ribosomales de procariotas y eucariotas.

Adaptada de "The general structure of ribosomes in prokaryotes and eukaryotes" Lodish, *et al.*, 2000 [58].

2.6.2 Secuenciación del ARN ribosomal

Los ARN ribosomales son los ARN no codificantes más abundantes y universales en los organismos vivos [56]. Se consideran excelentes cronómetros moleculares, por lo que su secuenciación es utilizada para determinar relaciones filogenéticas entre organismos [59].

2.6.3 ARN ribosomal 16S (ARNr 16S)

En procariotas, los genes que codifican los ARN ribosomales están organizados en operones ribosómicos [53]. El transcrito inicial de estos genes produce una molécula de pre-ARNr 30S que incluye las secuencias que codifican los ARNr 23S, 16S y 5S. Estas regiones se encuentran separadas por regiones espaciadoras o intergénicas (IG). El hecho de tener junta

la información genética que codifica estos tres componentes de ARNr asegura que, tras múltiples sucesos de transcripción, al montar los ribosomas habrá cantidades iguales de los tres componentes [53,54].

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 pares de bases (pb) que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma procarionte. El análisis de la secuencia del ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos ha revelado la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Estas son secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo [60].

El ARNr 16S es la molécula más utilizada para identificación bacteriana porque presenta las siguientes características:

- La secuencia se encuentra altamente conservada, presenta regiones comunes a todos los organismos y contiene regiones variables que se concentran en zonas específicas.
- Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales.
- Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariontes, contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
- El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.5 kb) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
- La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
- Es relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S, por lo que existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento [60,61].

En la figura 6 se muestran las regiones constantes y las regiones variables (V1-V9) del ARNr 16S.

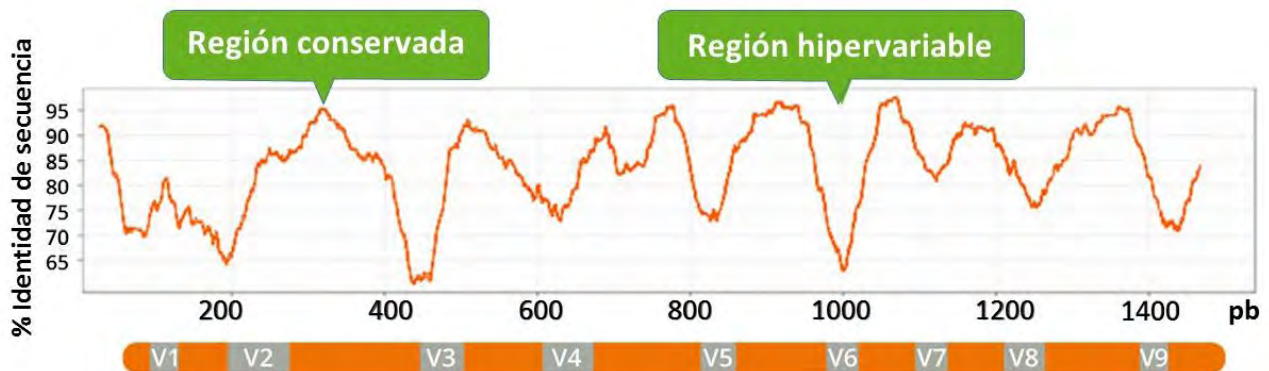


Figura 6. Regiones conservadas e hipervariables del ARNr 16S.

Adaptada de "Schematic overview of the 16S rRNA gene" Wahl, *et al.*, 2015 [62].

2.6.4 Espaciadores Transcritos Internos (ITS)

En eucariotas, los genes de ARNr forman parte de la fracción de ADN moderadamente repetido y se presentan agrupados en varias localizaciones cromosómicas. Cada agrupación está formada por repeticiones en tándem y cada unidad está separada por una secuencia no codificante de ADN espaciador [54].

En los eucariotas, tres de los cuatro ARNr que forman las subunidades pequeña y grande son generados a partir de un precursor de ARNr policistrónico: el pre-ARNr [56]. Los procesos post-transcripcionales dividen el pre-ARNr y eliminan dos espaciadores transcritos internos (ITS, por sus siglas en inglés). ITS1 e ITS2 son regiones variables situadas entre los genes conservados que codifican para los ARNr 18S, 5.8S y 25S/28S. Estos dos espaciadores, incluyendo el gen 5.8S, se denominan región ITS (figura 7) [56,63,64].

La región ITS (ITS1 - 5.8S - ITS2) del ARNr se amplifica fácilmente con cebadores universales que son compatibles entre la mayoría de las especies de hongos. Esta región presenta suficiente variabilidad genética para la identificación a nivel interespecífico y ha sido reconocida como la diana genética para la identificación de hongos y levaduras [63,65,66]. La región

completa de ITS en hongos tiene una longitud media de 500 y 600 pb para ascomicetos y basidiomicetos, respectivamente; y una longitud media de 600 pb a través de todos los linajes fúngicos [65].

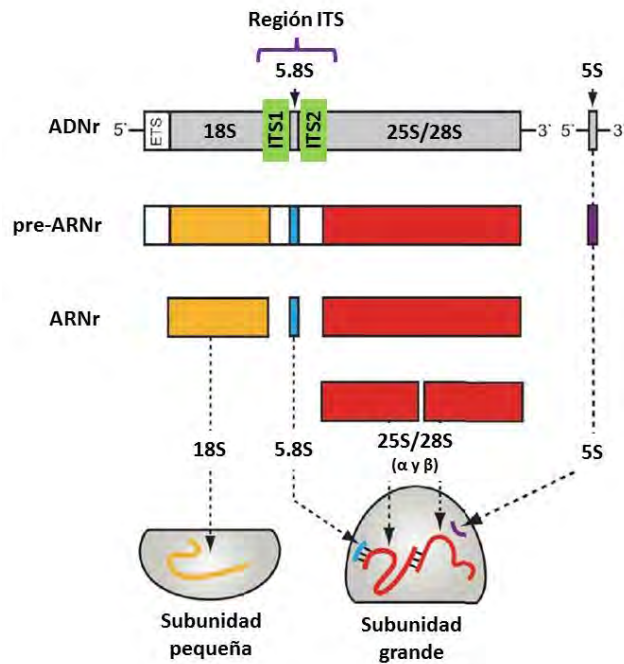


Figura 7. Ensamblaje de los ARNr en las subunidades del ribosoma en eucariotas.

Adaptada de "Assembly of rRNA into the ribosomal subunits in insects" Winnebeck, *et al.*, 2010 [67].

Como se mencionó previamente (véase punto 2.5.2) el uso de métodos moleculares basados en ácidos nucleicos para la identificación microbiana es una técnica ampliamente utilizada por su sensibilidad. Uno de los procedimientos más empleados se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual se describe a continuación.

➤ 2.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica de biología molecular usada para replicar enzimáticamente el ADN a partir de extractos de células completas o a partir de una mezcla compleja de ADN total de una muestra ambiental. La técnica fue desarrollada en 1983 por Kary Mullis y permite que una pequeña cantidad de la molécula de ADN molde se amplifique de manera exponencial. Es un método rápido, sensible, fácil, confiable y accesible [60,68].

Cada ensayo de PCR requiere la presencia de varios componentes básicos:

- ADN molde: contiene la región del fragmento de ADN a amplificar.
- Cebadores (forward y reverse): fragmentos cortos de ADN con una secuencia definida complementaria al ADN molde. Determinan el inicio y el final de la región a amplificar.
- Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs): a partir de los cuales la ADN polimerasa sintetiza la cadena nueva de ADN.
- ADN polimerasa termoestable: enzima que resiste elevadas temperaturas y que une los nucleótidos individuales para copiar la región de ADN a ser amplificada.
- Solución amortiguadora: proporciona un ambiente químico adecuado para la ADN polimerasa [68,69].

La PCR se desarrolla en ciclos repetitivos de 3 pasos (figura 8):

- Desnaturalización: la reacción se calienta por encima de la temperatura de disociación de las dos cadenas complementarias del ADN molde, lo que permite que las hebras se separen.
- Hibridación o alineamiento: se baja la temperatura para permitir que los cebadores específicos se unan a los segmentos del ADN molde. La hibridación entre los cebadores y el ADN molde se produce sólo si son complementarios en secuencia.
- Polimerización o elongación: la temperatura se eleva de nuevo, momento en el que la ADN polimerasa es capaz de extender los cebadores mediante la adición de nucleótidos a la cadena de ADN en crecimiento.

Múltiples repeticiones de este ciclo llevan a una amplificación exponencial del gen(es) o región genética [60,69].

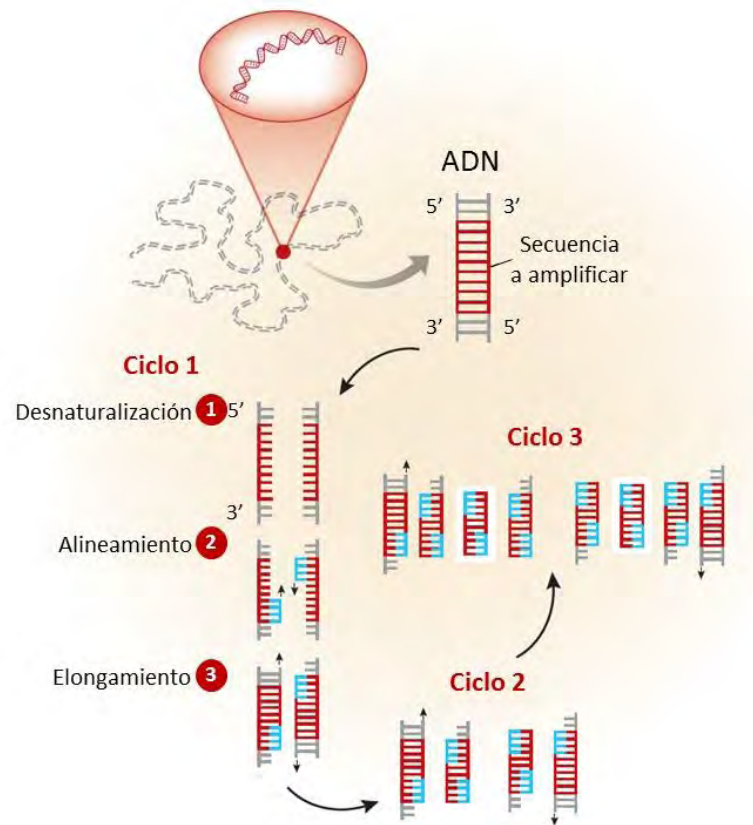


Figura 8. Presentación esquemática de la PCR.

Adaptada de "Schematic presentation of the polymerase chain reaction principle" Garibyan, 2013 [69].

Para realizar la identificación microbiana mediante la comparación nucleotídica de regiones génicas con información reportada en bases de datos es necesario realizar la secuenciación para obtener la información necesaria.

➤ 2.8 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN es el proceso mediante el cual se define la secuencia de nucleótidos (A, T, C, G) en una molécula de ADN. Las tecnologías de secuenciación incluyen una serie de métodos que se agrupan en general como: preparación del templado, secuenciación, obtención de imágenes y análisis de datos. La combinación única de protocolos específicos distingue una tecnología de otra y determina el tipo de datos producidos desde cada plataforma [70]. La secuenciación moderna del ADN comenzó en 1977, con el desarrollo del método químico de Maxam y Gilbert y el método didesoxi de Sanger, Nicklen y Coulson [71,72].

2.8.1 Método de Sanger

El método de Sanger es un procedimiento que implica la síntesis enzimática de una molécula de ADN complementaria utilizando 2'-desoxinucleótidos (dNTP) y 2',3'-didesoxinucleótidos (ddNTPs) de terminación de síntesis [71,73].

La secuenciación automática de Sanger se lleva a cabo en una *única reacción* e implica un templado de ADN monocatenario, un cebador específico para iniciar la reacción, los cuatro 2'-desoxinucleótidos estándar (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) y ADN polimerasa. La polimerasa añade bases a una cadena de ADN que es complementaria al ADN molde de cadena sencilla. Entonces se añaden los cuatro 2',3'-didesoxinucleótidos marcados (ddATP, ddTTP, ddCTP o ddGTP) a la reacción en una concentración menor que los dNTPs estándar. Debido a que los didesoxinucleótidos carecen del grupo 3'-OH, cada vez que son incorporados por la ADN polimerasa se interrumpe la síntesis de la cadena de ADN en crecimiento (figura 9). Cuatro diferentes ddNTPs se utilizan de tal manera que la cadena no siempre termina en el mismo nucleótido. La competencia entre los procesos de síntesis y terminación, da como resultado la generación de un conjunto de fragmentos que difieren en unidades de nucleósido monofosfato [73,74]. A medida que estos fragmentos marcados pasan a través del detector, los fluoróforos son excitados por un láser en el secuenciador de ADN, produciendo emisiones de fluorescencia de cuatro colores diferentes. La detección de la fluorescencia proporciona un gráfico de cuatro colores (electroferograma) que revela la secuencia de ADN [70,73].

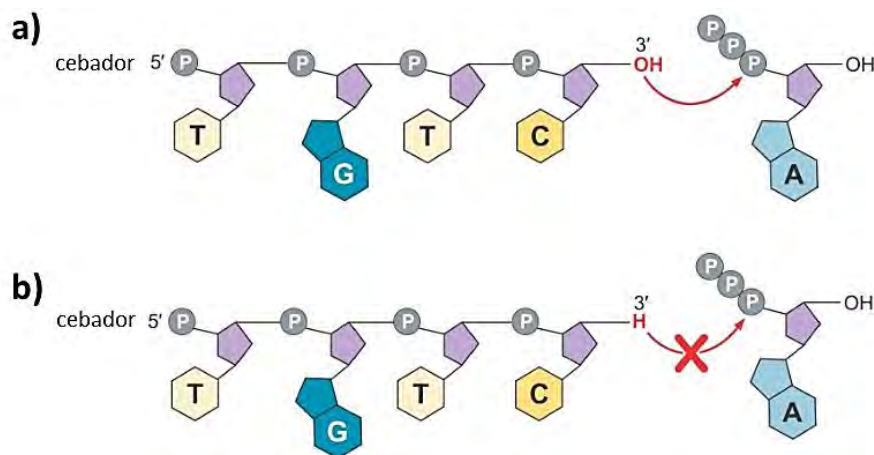


Figura 9. Adición de nucleótidos trifosfatados por la ADN polimerasa. a) La adición de un dNTP permite la elongación de la cadena de ADN; b) la adición de un ddNTP interrumpe la síntesis de la cadena de ADN.

Watson, *et al.*, 2014 [75].

El presente trabajo tiene el objetivo de estudiar la presencia de bacterias acidófilas (particularmente *Lactobacillus*) en superficies del Metro de la CDMX. Los lactobacilos presentan relevancia tanto en la industria alimentaria como en el ámbito de la salud pública, sin embargo, no se han realizado investigaciones respecto a dicho género bacteriano en los sistemas de transporte subterráneo. A continuación se describen las principales características y la importancia de dichas bacterias.

➤ 2.9 El género *Lactobacillus* y su importancia

Los *Lactobacillus* son bacterias Gram-positivas que pertenecen al phylum *Firmicutes*. Presentan forma de bacilos que varían desde células largas y delgadas hasta cocobacilos cortos, formando ocasionalmente cadenas cortas. Estas bacterias no forman esporas, son anaerobias aerotolerantes y carecen de motilidad [76]. Los lactobacilos requieren la presencia de muchos factores de crecimiento para su desarrollo en medio de cultivo, por lo que se consideran microorganismos nutricionalmente exigentes [13]. El género *Lactobacillus* es un representante de las bacterias productoras de ácido láctico. En los seres humanos, los lactobacilos se encuentran como comensales en los tractos orales, gastrointestinales y genitourinales [77,78]. Además, en estudios de metagenómica se han encontrado en diversas zonas anatómicas externas del cuerpo, por lo que también se consideran residentes comunes de la piel [79]. Hasta el 2011 se tenían identificadas más de 120 especies de *Lactobacillus* [76].

Algunas especies de *Lactobacillus* se utilizan como probióticos (microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, confieren un efecto sobre la salud del huésped [OMS, 2001]). Los nuevos conocimientos sobre las interacciones entre los probióticos y los receptores del huésped han demostrado la capacidad de los probióticos para modular la expresión genética y la diferenciación celular del sistema inmunitario. Debido a su influencia en la regulación inmune, se ha descrito que algunos lactobacilos (*L. reuteri*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*) presentan efectos anti-inflamatorios sistémicos, pero también pueden ejercer su efecto de manera local [78,80,81].

Algunos lactobacilos también son poseedores de efectos antimicrobianos. Por ejemplo, *Lactobacillus plantarum* produce péptidos antimicrobianos que juegan un papel importante en la eliminación de potenciales agentes patógenos cutáneos [80].

En la microbiota vaginal se encuentran diversas especies *Lactobacillus*, sin embargo, sólo cuatro son dominantes (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*), mientras que otras especies son raras. Aparentemente promueven un medio vaginal saludable produciendo ácido láctico para mantener un ambiente ácido que es inhóspito para muchas bacterias. También producen peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo tóxicos con efecto antibiótico y bacteriocinas [76].

Aunque los lactobacilos rara vez causan enfermedad en el ser humano, se consideran patógenos oportunistas [13]. El género *Lactobacillus* ha sido relacionado a diferentes patologías como endocarditis, bacteremia, peritonitis, abscesos y meningitis [78].

La bacteriemia causada por *Lactobacillus* no es frecuente, sin embargo, se han detectado como factores de riesgo la presencia de enfermedades subyacentes graves en individuos inmunocomprometidos; así como cirugía previa y terapia antibiótica prolongada ineficaz para lactobacilos. En los casos de bacteriemia, se han identificado varias especies de *Lactobacillus*, pero las dos especies más comunes han sido *L. casei* y *L. rhamnosus*, ambas son también ampliamente utilizadas como probióticos [77,78].

3) JUSTIFICACIÓN

En este trabajo se busca realizar la caracterización de bacterias acidófilas cultivables, en particular del género *Lactobacillus*, a partir de muestras superficiales del Metro de la CDMX. Se han descrito propiedades tanto benéficas como perjudiciales para la salud humana ocasionadas por lactobacilos, por lo que la identificación y comprensión de las condiciones ambientales que modifican la cantidad y/o permiten la transmisión de dichas bacterias entre las personas y las superficies del Metro de la CDMX es de gran interés por el impacto que puede presentar principalmente en el ámbito de la salud pública.

La información que se trata de obtener con esta investigación es complementaria a los antecedentes microbiológicos encontrados en diversos subterráneos alrededor del mundo porque está dirigida al análisis de un grupo microbiano incapaz de crecer en medio de cultivo general.

En este estudio se utiliza un medio de cultivo selectivo (MRS) que promueve el crecimiento de microorganismos acidófilos (incluyendo *Lactobacillus*) por lo cual se aumenta la probabilidad de encontrar a las bacterias deseadas, que aunque se sabe por análisis independientes de cultivo que están presentes en los sistemas de transporte subterráneos no han sido descritas en dicho ambiente porque ningún estudio las ha investigado de manera específica.

La identificación de los lactobacilos se realiza mediante técnicas moleculares dependientes de ácidos nucleicos y basadas en PCR porque han demostrado ser metodologías confiables y sensibles.

4) OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar mediante técnicas moleculares bacterias acidófilas cultivables encontradas en superficies del Sistema de Transporte Colectivo Metro de la CDMX.

4.2 Objetivos particulares

- Realizar el aislamiento de bacterias del género *Lactobacillus* obtenidas a partir de tubos y pasamanos de las líneas 1 (rosa) y 7 (naranja) del Metro de la CDMX.
- Extraer, cuantificar y purificar el ADN genómico de los aislados obtenidos.
- Amplificar el gen del marcador molecular bacteriano ARNr 16S.
- Obtener las secuencias del ARNr 16S.
- Hacer uso de herramientas de bioinformática para la identificación de los microorganismos encontrados.
- Identificar y comparar las principales especies cultivables de lactobacilos que se encuentran en superficies del metro de la CDMX.
- Determinar la relación existente entre la diversidad y cantidad de *Lactobacillus* encontrados en el STC Metro con factores ambientales como temperatura, humedad relativa y presencia humana.

5) MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio, todos los reactivos utilizados fueron marca Sigma-Aldrich, a menos que se indique otra cosa.

5.1 Toma de muestras

Se tomó un total de 48 muestras de 300 cm² (c/u) durante los días 3 y 13 de Octubre de 2016 en las líneas rosa (L1) y naranja (L7) del Sistema de Transporte Colectivo Metro de la Ciudad de México, entre las 10:30 y las 13:00 horas. 32 muestras se obtuvieron de tubos de vagones diferentes cuando los trenes se encontraban en movimiento (16 de L1 y 16 de L7), y 16 muestras de pasamanos de la estación Tacubaya (8 de L1 y 8 de L7). Para todas las muestras se registraron metadatos de hora, temperatura y humedad relativa al momento del muestreo; además para aquellas muestras obtenidas al interior de un vagón se registró también el número de pasajeros presentes.

Las muestras se obtuvieron por frotación de los tubos de acero inoxidable (tubos verticales aledaños a las puertas en el caso de vagones y en los pasamanos de las escaleras de acceso a los andenes) con un hisopo estéril humedecido en medio de transporte Amies (NaCl 3 g/L, KCl 200 mg/L, CaCl₂ 100 mg/L, MgCl₂ 100 mg/L, KH₂PO₄ 200 mg/L, Na₂HPO₄ 1.150 g/L, tioglicolato de sodio 1 g/L) y utilizando una plantilla de 100 cm² (usada tres veces por muestra). Posteriormente, los hisopos se introdujeron en tubos de microcentrífuga (1.5 mL) que contenían 400 µL del medio de transporte Amies y se colocaron en hielo hasta su procesamiento en el laboratorio.

5.2 Cultivo

Posterior a la homogeneización de las muestras se tomaron 300 µL y se vertieron en cajas Petri con medio selectivo para *Lactobacillus* [82,83] (MRS modified, Vegitone; Sigma-Aldrich; agar 1.5%, pH 5.5), se extendió el inóculo sobre las superficies de las placas con la ayuda de perlas estériles y se incubaron a 35° C durante 7 días. De la misma manera, se inocularon 50

µL del homogeneizado en cajas Petri con medio de cultivo general (agar 9 g/L, dextrosa 1 g/L, triptona 5 g/L, extracto de levadura 2.5 g/L, pH 7±0.2) y se incubaron a 35° C durante 5 días.

5.3 Análisis macroscópico

Se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) encontradas en los dos medios de cultivo empleados. Para cada colonia diferente observada en el medio MRS se obtuvo el registro fotográfico y la descripción morfológica: forma, borde, textura, color de colonia y color del medio (para las cajas de medio general sólo se realizó el conteo de colonias y ahí concluyó su análisis).

5.4 Extracción de ADN genómico

A partir del medio MRS se seleccionaron 30 colonias aisladas y se realizaron suspensiones en tubos de microcentrífuga (1.5 mL) con 20 µL de agua inyectable y posteriormente se adicionaron 50 µL de solución amortiguadora de lisis TES (tris-HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 1 mM; SDS 0.5% [m/v]). Las suspensiones se incubaron a 95° C durante 15 min y enseguida se colocaron a -20° C durante 20 min. Después las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 5 min, se recuperaron 35 µL del sobrenadante y se colocaron en un microtubo limpio. Para finalizar, los extractos se diluyeron hasta un volumen final de 200 µL con agua inyectable y se mantuvieron en congelación (-20° C) hasta su análisis.

5.5 Amplificación de ADN mediante PCR

Para el gen bacteriano ARNr 16S se utilizaron los cebadores universales 27f y 1492r mientras que para las regiones fúngicas ITS1-5.8S-ITS2 se utilizaron los cebadores universales ITS1 e ITS4. Las características de los cebadores utilizados se encuentran descritas en la tabla 2.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL el cual estaba compuesto por solución amortiguadora de reacción (1X), MgCl₂ (2 mM), dNTP's (0.3 mM c/u), cebadores (0.25 mM c/u), Taq polimerasa (1 U), 1 µL de extracto de ADN y agua cbp 20 µL. Se incluyeron controles positivo y negativo en cada reacción de PCR.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados.

Cebador	Dirección	Secuencia (5' a 3')	Referencia
27f	Forward	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[84]
1492r	Reverse	GGTTACCTTGTTACGACTT	[84]
ITS1	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[85]
ITS4	Reverse	CCTCCGCTTATTGATATGC	[85]

Los controles positivos contenían la mezcla de reacción con las mismas concentraciones indicadas en el párrafo anterior. Para las PCR del gen bacteriano 16S se añadió 1 µL de extracto de ADN proveniente de *Escherichia coli* MC1061, y para las PCR de la región ITS fúngica el extracto de ADN provenía de *Saccharomyces cerevisiae* de levadura para cocinar comercial. En el caso de los controles negativos de ambos casos se colocó la mezcla de reacción sin muestra de ADN. En la tabla 3 se muestran las condiciones que se programaron en el termociclador (MJ Mini, Bio-Rad) para llevar a cabo las reacciones de PCR.

Tabla 3. Condiciones para la PCR.

# Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Etapas
1	92	120	Desnaturalización inicial
30	92	30	Desnaturalización
	55	30	Alineamiento
	72	90	Elongación
1	72	300	Elongamiento final

Para corroborar la presencia de los amplicones deseados se corrieron los productos de PCR en gel de agarosa (UltraPure Agarose, Invitrogen) al 1% (m/v) con solución amortiguadora de corrida TAE 0.8X (Tris 32 mM pH 7.5; acetato 16 mM; EDTA 0.8 mM) y marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific). Posteriormente los geles fueron teñidos con GelRed y revelados en transiluminador con lámpara de luz UV utilizando un filtro de 254 nm.

En el caso del gen ARNr 16S se esperaba una banda alrededor de 1.5 kb, mientras que para las región ITS se esperaba entre 500 y 600 pb.

5.6 Purificación de productos de PCR

Para la purificación de los productos de PCR se adicionaron 150 μ L de solución amortiguadora de unión (clorhidrato de guanidina 2M, pH 7.5; isopropanol 30%) a los microtubos para PCR y tras homogeneizar se pasó todo el contenido a las columnas de sílice (High Pure, Roche) con tubos colectores y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 min. A continuación se vaciaron los tubos colectores, se adicionaron 200 μ L de solución amortiguadora de lavado (tris-HCl 10 mM, pH 7.5; etanol 80%) a las columnas y se centrifugaron de nuevo a 14,000 rpm durante 1 min. Tras vaciar los tubos colectores siguió un paso de secado que consistió en centrifugar a 14,000 rpm durante 2 min. Para finalizar, se desecharon los tubos colectores y fueron sustituidos por tubos de microcentrifuga nuevos (1.5 mL), se añadieron 50 μ L de solución amortiguadora de elución (agua inyectable a 50° C) a las columnas y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 min.

5.7 Análisis de productos de PCR purificados

Tras la purificación de los productos de PCR se realizaron barridos espectrales desde 220 nm hasta 350 nm con el uso de un espectrofotómetro UV (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific) para corroborar la calidad del ADN. También se determinó la concentración de ADN obtenido en cada muestra, esto para decidir el volumen tanto de ADN purificado como de cebador (27f o ITS1 según el caso) necesarios para el llenado de los pozos de la microplaca que se envió a secuenciación de acuerdo a la información de la tabla 4.

Tabla 4. Especificaciones de llenado de pozos de microplaca para secuenciación.

Conc. de ADN (ng/ μ L)	Vol. de ADN (μ L)	Vol. de cebador (μ L)	Vol. de agua (μ L)	Vol. total en pozo (μ L)
< 20	8.5	1.5	0	10
> 20	5	2	3	10

5.8 Secuenciación

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados por MACROGEN, Inc. Corea (10F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu, Seúl, 08511, República de Corea) mediante la técnica de Sanger (tecnología ABI PRISM) utilizando el cebador 27f o ITS1. Una vez obtenidos los electroferogramas en formato .ab1 fueron visualizados con el programa FinchTV y se seleccionaron los fragmentos de las secuencias que se utilizarían para la identificación.

5.9 Identificación microbiana

Se realizó el alineamiento de las regiones seleccionadas del gen bacteriano ARNr 16S con las secuencias disponibles en el Proyecto de Base de Datos Ribosomal (RDP, por sus siglas en inglés; <https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) [86] y en la Base de Datos del GenBank utilizando la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local (BLAST, por sus siglas en inglés; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [87]. Las secuencias de las regiones fúngicas ITS se analizaron con la Base de datos de ITS de Ectomycorrizas Nórdicas (UNITE, por sus siglas en inglés <https://unite.ut.ee/>) [88] y con la base de datos de ITS establecida por la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ISHAM, por sus siglas en inglés; <http://its.mycologylab.org/>) [66].

5.10 Análisis estadístico

Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson [89] para determinar la relación existente entre las condiciones ambientales (número de pasajeros, temperatura y % de humedad relativa) y la cantidad de UFC encontradas en los medios de cultivo utilizados. Se consideró correlación fuerte si $R^2 > 0.5$, correlación intermedia si $R^2 = 0.5$ y baja correlación si $R^2 < 0.5$. Los datos de temperatura, porcentaje de humedad relativa y número de pasajeros presentaron una distribución normal de acuerdo a la prueba de Lilliefors [90], por lo que los análisis estadísticos de los metadatos se realizaron mediante pruebas de t para datos independientes [91]. El número de UFC encontradas no presentaron distribución normal, por lo que los análisis estadísticos para estos datos se realizaron mediante pruebas no paramétricas Mann-Whitney U [92]. El nivel de significancia fue $\alpha = 0.05$ para todos los análisis estadísticos realizados.

6) RESULTADOS

6.1 Metadatos registrados durante el muestreo

Se tomaron 48 muestras superficiales a partir de vagones (32 muestras) y pasamanos (16 muestras) en las líneas rosa y naranja del STC Metro de la CDMX para analizar la cantidad y diversidad de bacterias cultivables del género *Lactobacillus*. A continuación se presentan los valores promedio de número de pasajeros, temperatura y porcentaje de humedad relativa registrados durante la colecta de muestras (tabla 5).

Tabla 5. Número de pasajeros, temperatura y porcentaje de humedad relativa registrados durante el muestreo en los vagones y pasamanos de las líneas rosa y naranja.

Línea	Muestra	# Pasajeros	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)
Rosa	Vagones	54 ± 25	30.6 ± 1.2	51 ± 5
	Pasamanos	-----	30.5 ± 0.5	50 ± 5
Naranja	Vagones	49 ± 26	30.9 ± 1.1	52 ± 10
	Pasamanos	-----	29.1 ± 0.4	50 ± 5

Se muestran los promedios ± desviación estándar.

Dieciséis muestras fueron obtenidas en los vagones de la línea rosa en donde el número de pasajeros varió desde 26 hasta 110 (54 en promedio); la temperatura mínima registrada fue de 28.0° C y la máxima de 32.1° C (30.6° C en promedio) y el porcentaje de humedad relativa se encontró en un rango de 41% a 58% (51% en promedio). En la misma línea, pero en pasamanos de escaleras de acceso a los andenes, se recolectaron ocho muestras en donde la temperatura varió desde 29.8° C hasta 31.1° C (30.5 °C en promedio) y el porcentaje de humedad relativa se encontró en un intervalo de 42% a 59% (50% en promedio).

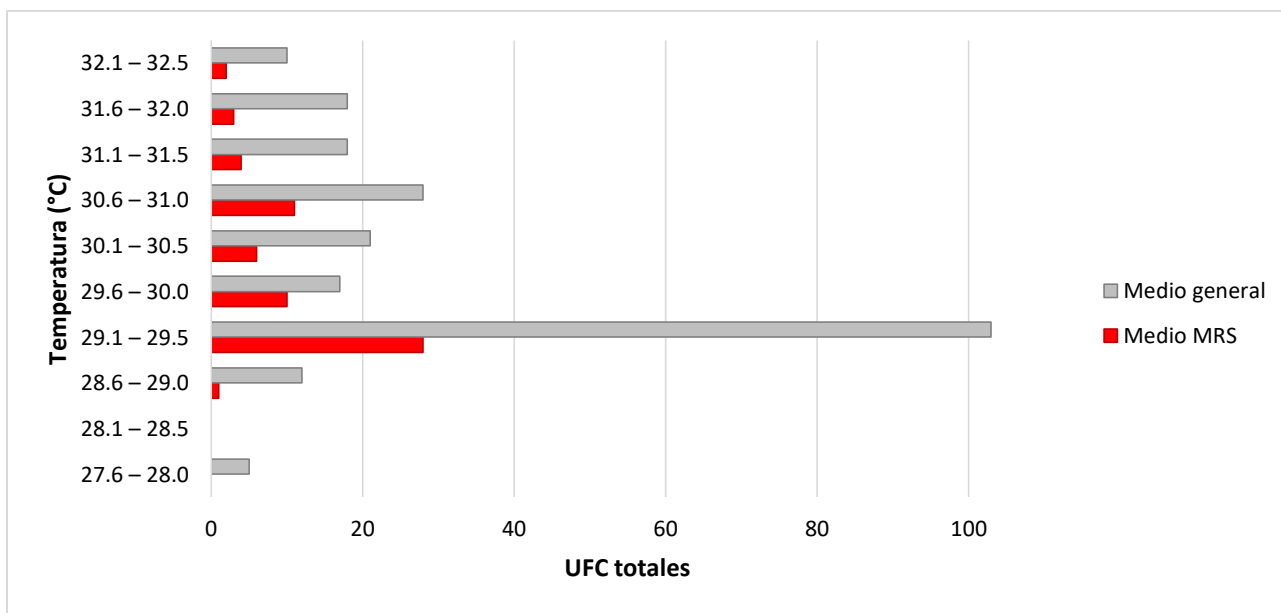
En la línea naranja se tomaron dieciséis muestras al interior de vagones, en donde los intervalos de número de pasajeros, temperatura y porcentaje de humedad relativa encontrados fueron 19 – 98, 28.7° C – 32.4° C y 40% – 72% respectivamente (valores promedio de 49,

30.9° C y 52% respectivamente). En el caso de las ocho muestras procedentes de los pasamanos de la línea naranja, los valores de temperatura variaron entre 28.5° C y 29.7° C (29.1° C en promedio), mientras que los de porcentaje de humedad relativa se encontraron entre 44% y 57% (50% en promedio).

Los análisis estadísticos realizados (pruebas de t para datos independientes) indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre el número de pasajeros, los valores de temperatura, o el porcentaje de humedad relativa registrados en ambas líneas al interior de los vagones. En los pasamanos, la temperatura de la línea rosa fue mayor que en la línea naranja y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); mientras que el porcentaje de humedad relativa no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$).

La cantidad de UFC obtenidas en los medios de cultivo utilizados (medio general y medio MRS) se vio modificada por la temperatura, la humedad relativa y el número de personas presentes al momento del muestreo, pero en ningún caso se encontró una buena correlación (R^2 de Pearson = 0.002 – 0.18) entre las UFC y las condiciones ambientales o el número de pasajeros. Por otro lado, se determinaron fuertes correlaciones tanto entre el número de personas y la temperatura ($R^2 = 0.69$), como entre el número de personas y la humedad relativa ($R^2 = 0.75$).

Gráfico 1. UFC totales vs temperatura registrada durante el muestreo.



Cuando la temperatura se encontraba entre 29.1° C y 29.5° C se obtuvo el mayor número de aislamientos en los dos medios de cultivo (gráfico 1); 103 UFC en el medio general y 28 UFC en el medio selectivo. El mayor número de UFC se logró cuando el porcentaje de humedad relativa se encontraba entre 46% y 55% (gráfico 2), intervalo en donde se consiguió el aislamiento de 170 UFC en el medio general y 54 UFC en el medio MRS. Cuando el número de pasajeros presentes al interior del vagón se encontraba entre 51 y 60 personas (gráfico 3) se recuperaron 75 UFC en el medio general y 22 UFC en el selectivo.

Gráfico 2. UFC totales vs % humedad relativa registrada durante el muestreo.

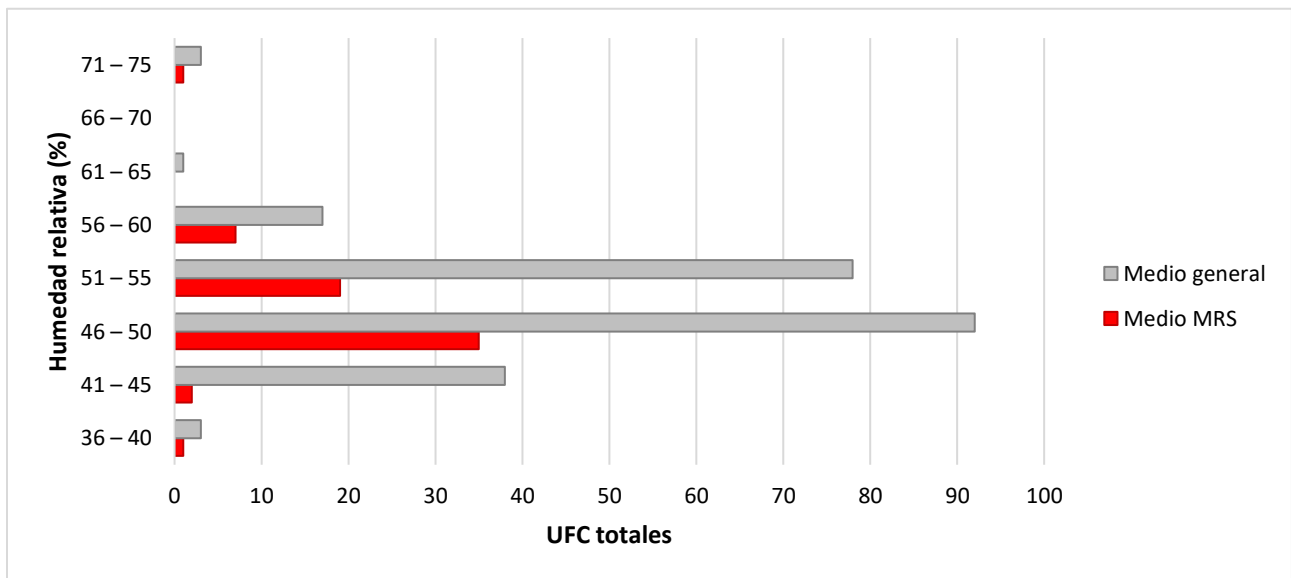
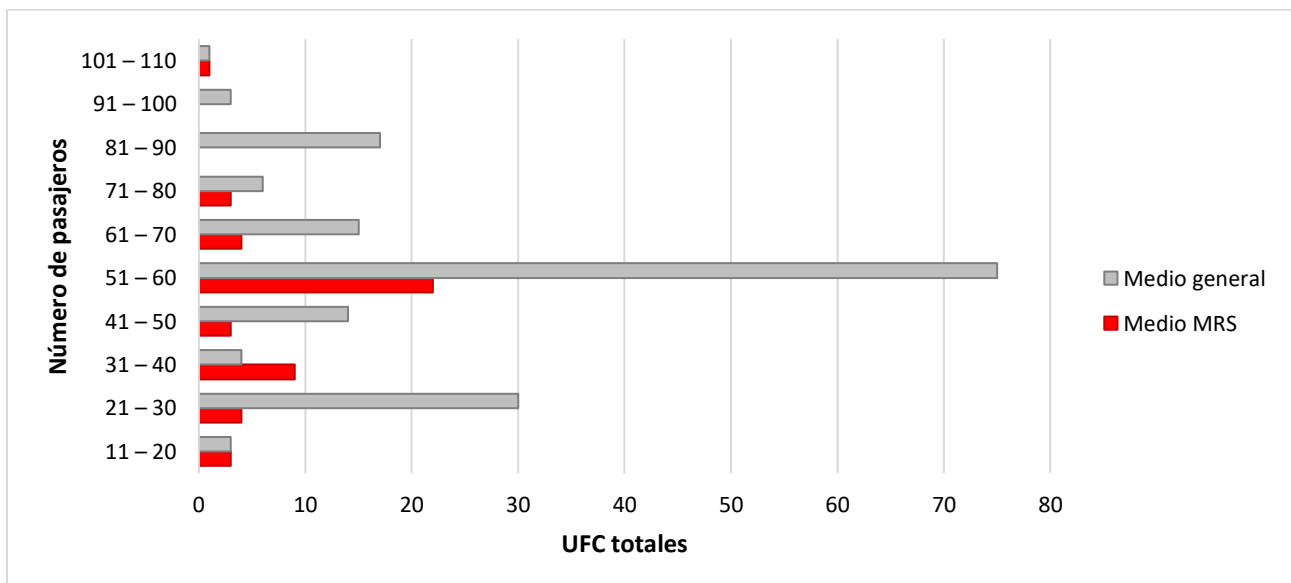


Gráfico 3. UFC totales vs número de pasajeros presentes durante el muestreo.

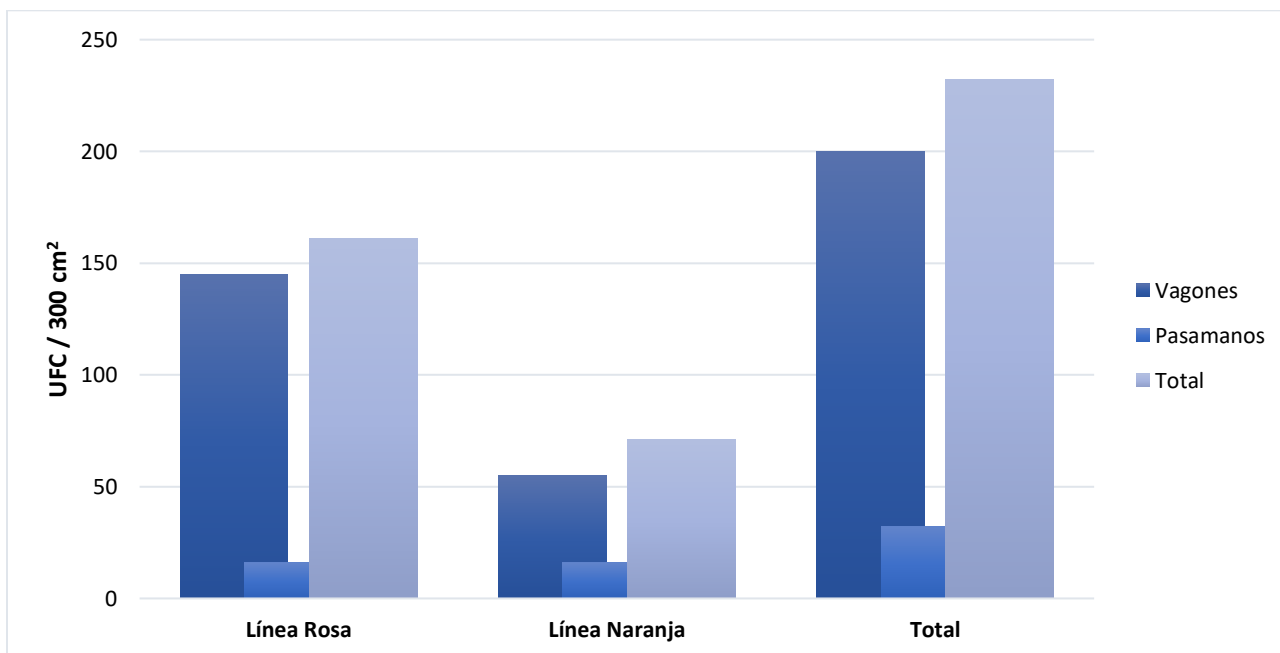


6.2 Determinación de UFC / 300 cm² en los medios de cultivo general y MRS

Del total de UFC obtenidas (297 UFC) a partir de las 48 muestras superficiales en los dos medios de cultivo empleados (general y MRS), el 78% (232 UFC) se encontró en medio de cultivo general y el 22% (65 UFC) en el medio selectivo para lactobacilos.

De las 232 UFC encontradas en el medio general (gráfico 4), 161 UFC se obtuvieron a partir de las muestras de la línea rosa y 71 UFC se encontraron en las muestras de la línea naranja. De las muestras del interior de vagones, se obtuvieron 145 UFC en la línea rosa y 55 UFC en la línea naranja, y en ambas líneas se encontraron 16 UFC a partir de los pasamanos. Aunque aparentemente es mayor la cantidad de UFC encontradas en las muestras procedentes de la línea rosa no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$; pruebas no paramétricas Mann-Whitney U) al comparar el número de UFC obtenidas en vagones de ambas líneas, al comparar el número de UFC obtenidas en pasamanos de ambas líneas, o al comparar el número de UFC totales en ambas líneas.

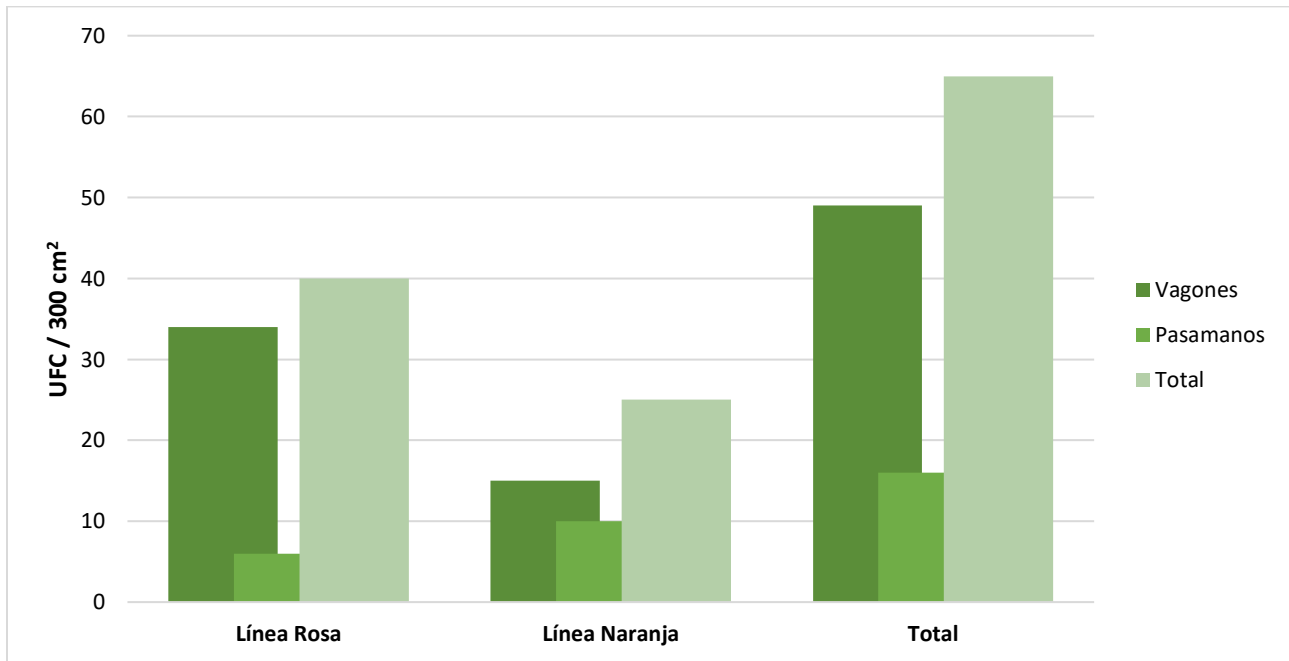
Gráfico 4. UFC obtenidas en medio general a partir de superficies de las líneas rosa y naranja.



En el medio selectivo para *Lactobacillus* (MRS) se logró el aislamiento de 65 UFC (gráfico 5), de las cuales 40 UFC procedieron de la línea rosa y 25 UFC de la línea naranja. De las

muestras obtenidas en vagones, 34 UFC se obtuvieron de muestras de la línea rosa y 15 UFC de la línea naranja, mientras que en las muestras de pasamanos 6 UFC se encontraron en muestras de línea rosa y 10 en la línea naranja. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) al comparar el número de UFC obtenidas en ambas líneas en vagones, pasamanos, o el total.

Gráfico 5. UFC obtenidas en medio MRS a partir de superficies de las líneas rosa y naranja.




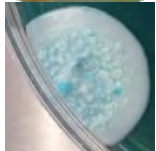


Se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el número de UFC totales encontradas en el medio general y el número de UFC totales encontradas en el medio selectivo, por lo que aparentemente, sólo el medio de cultivo utilizado tuvo un efecto sobre la cantidad de UFC obtenidas.

6.3 Descripción morfológica de las UFC encontradas en medio MRS

A partir de 48 muestras superficiales inoculadas en el medio selectivo para lactobacilos (MRS) se obtuvieron 65 UFC y 4 morfologías diferentes (tabla 6). Se encontraron 29 UFC con la morfología 1, 31 UFC con la morfología 2, 4 UFC con la morfología 3 y sólo 1 UFC con la morfología 4.

Tabla 6. Descripciones de morfologías encontradas en medio MRS (35° C, 7 días).

Morfología	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color de colonia	Color del medio	Imagen
1	Circular	Entero	Convexa	Cremosa y brillante	Rojo-rosa	Cambió a verde azulado	
2	Irregular	Lobulado	Plana	Rocosa y mate	Verde aceituna	Sin cambios	
3	Circular	Entero	Convexa	Cremosa y brillante	Azul claro al centro con halo blanco	Sin cambios	
4	Circular	Entero	Convexa	Cremosa y brillante	Azul con blanco al centro y halo blanco	Sin cambios	

Todas las UFC que exhibieron la morfología 2 presentaron un crecimiento mucho más lento y limitado en comparación con las otras morfologías.

6.4 Amplificación de ADN mediante PCR

Tras la extracción del ADN genómico de las UFC procedentes del medio selectivo para *Lactobacillus* se comenzó con la amplificación del gen bacteriano ARNr 16S mediante PCR, sin embargo, no fue posible la obtención de amplicones en muchas de las muestras a pesar de que los controles positivo y negativo indicaban que la reacción se llevaba a cabo correctamente. Dichas observaciones junto con el análisis morfológico de las colonias sugerían que probablemente se tenía un conjunto de UFC tanto de origen fúngico como bacteriano, por lo que se inició con la amplificación de la región ITS fúngica para corroborarlo.

En la figura 10 se muestran algunos productos de PCR del gen bacteriano ARNr 16S y de la región fúngica ITS. Con dichos resultados se comprobó que las colonias obtenidas en el medio MRS efectivamente procedían tanto de hongos como de bacterias.

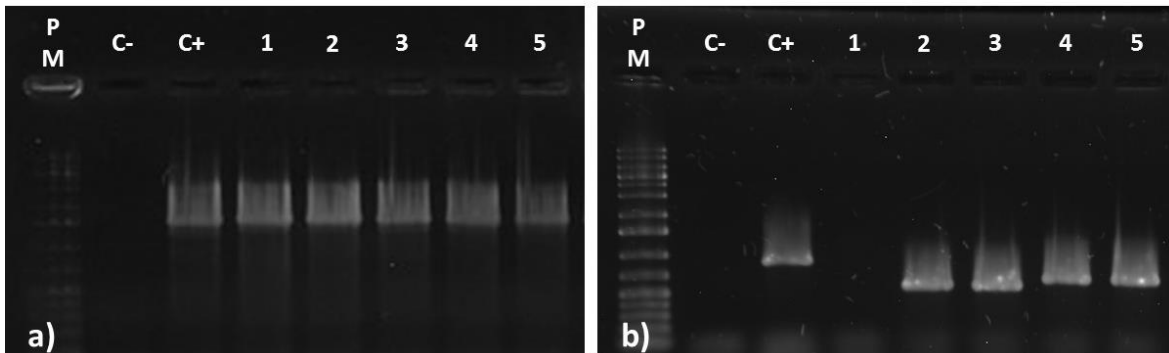


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1%. En ambos geles PM indica el marcador de peso molecular; C- y C+ representan los controles y los números (1-5) los amplicones obtenidos con diferentes muestras de ADN.

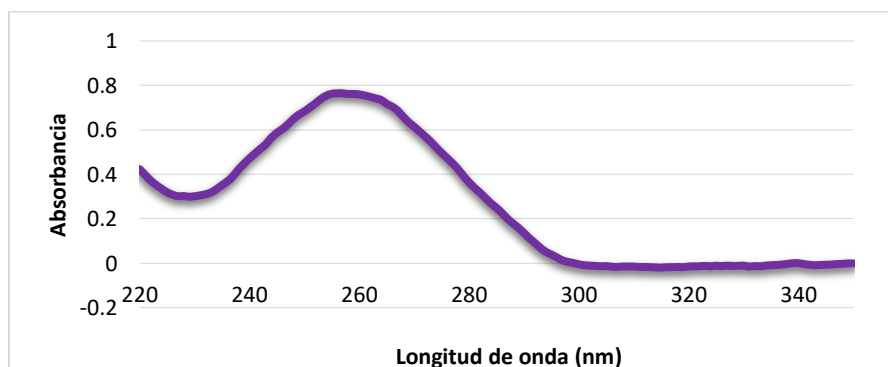
a) PCR del gen bacteriano ARNr 16S; b) PCR de la región fúngica ITS.

6.5 Purificación de productos de PCR

Una vez obtenidos los amplicones del gen bacteriano ARNr 16S o de la región fúngica ITS de las UFC encontradas en el medio de cultivo MRS se prosiguió con la purificación de los productos de PCR. Para comprobar que el protocolo de purificación se realizó eficientemente y que la concentración de ADN presente en las muestras purificadas era adecuada para la técnica de secuenciación se realizaron barridos espectrales desde 220 nm hasta 350 nm.

En el gráfico 6 se muestra el espectro de absorción de un producto de PCR purificado, en donde es posible observar un pico cercano a 260 nm, longitud de onda en la que los ácidos nucleicos presentan su máxima absorción, lo que significa que la presencia de proteínas u otros contaminantes es mínima. A 260 nm la absorción es proporcional a la concentración de ADN en la muestra (dato obtenido de forma automática por el espectrofotómetro utilizado).

Gráfico 6. Espectro de absorción de producto de PCR purificado.



Entre los productos de PCR purificados se seleccionaron 20 muestras que presentaran un grado de pureza y concentración de ADN apropiados para el proceso de secuenciación. De las muestras seleccionadas, ocho procedían de UFC que exhibían la morfología 1 (tabla 6), siete de UFC con morfología 2, las cuatro con morfología 3 y la única con morfología 4.

6.6 Secuenciación

Los 20 productos de PCR purificados y seleccionados en base a su calidad y concentración de ADN se enviaron a secuenciar a la compañía MACROGEN mediante la técnica de Sanger, la cual a su vez hizo llegar los electroferogramas (figura 11) con las secuencias encontradas en cada muestra. Las señales tanto al inicio como al final de las secuencias obtenidas no eran claras, por lo que se utilizó el programa FinchTV (versión 1.4.0) para seleccionar los fragmentos de las secuencias que se utilizarían para la identificación microbiana.

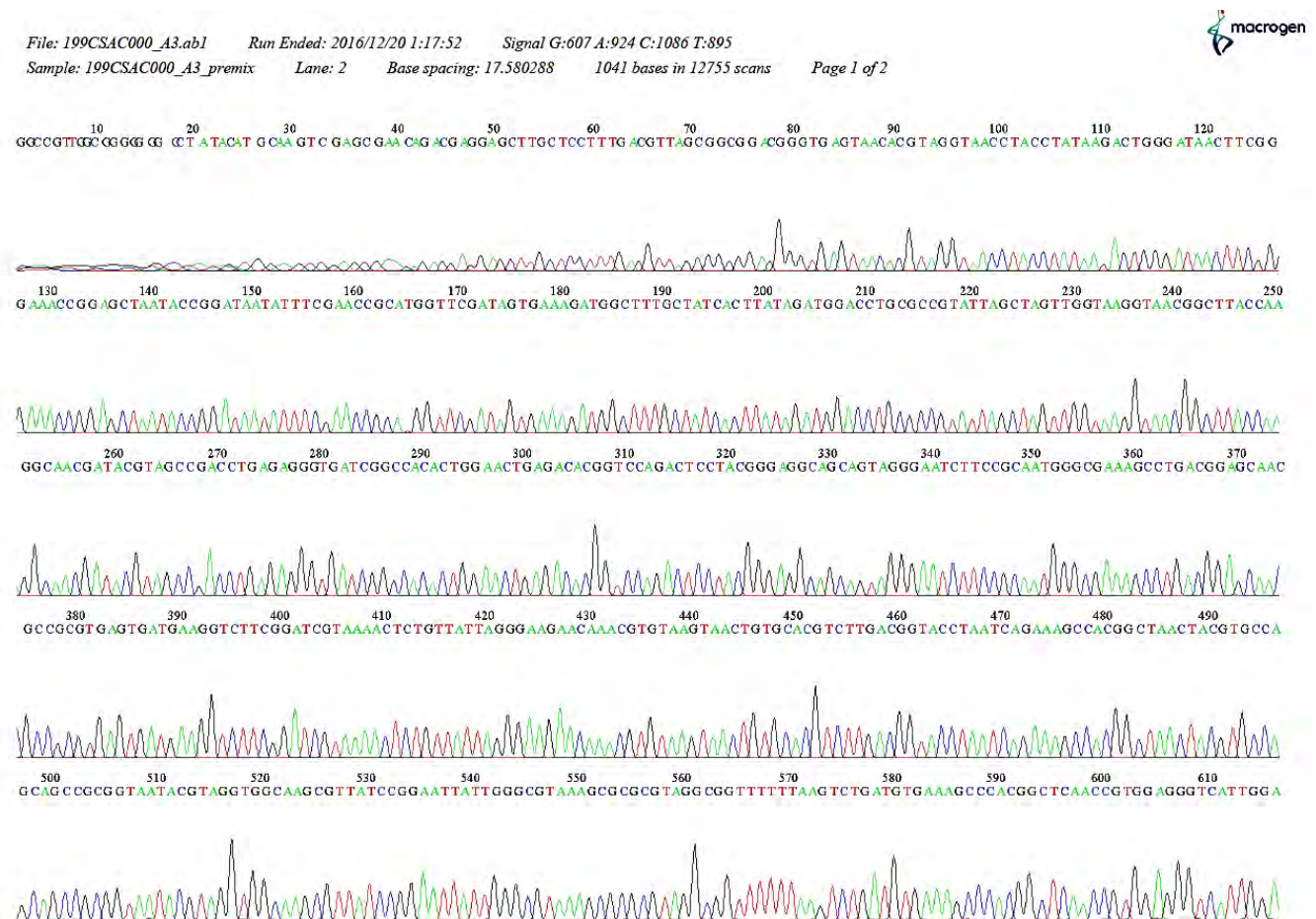


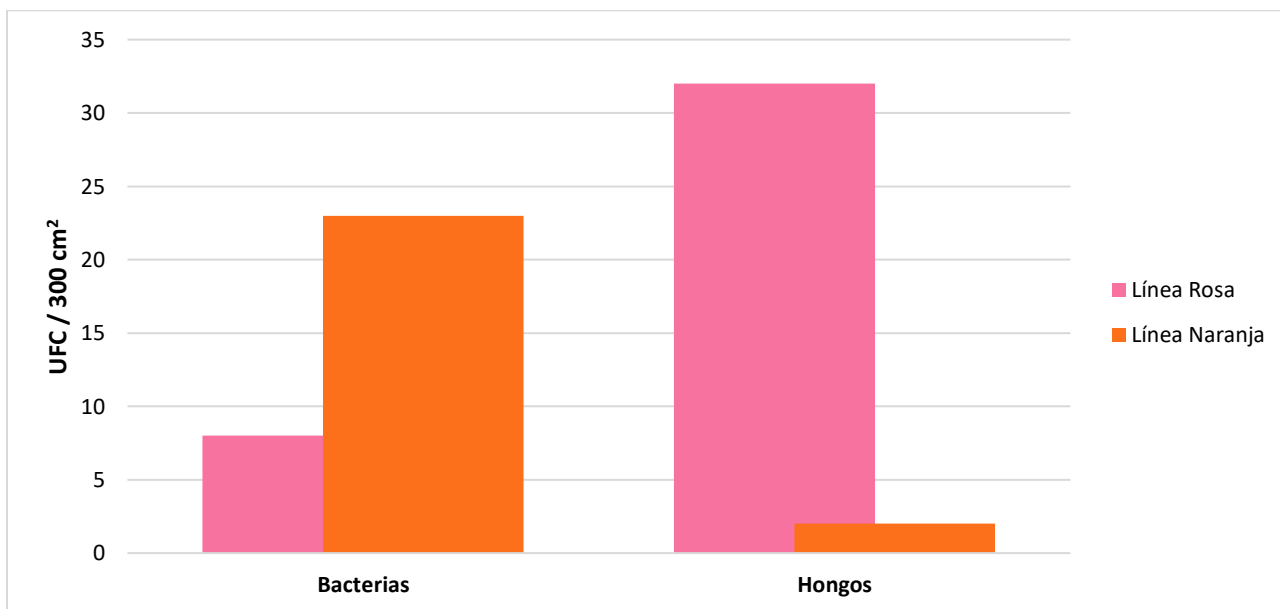
Figura 11. Electroferograma obtenido mediante la secuenciación de una muestra de ADN empleando el método de Sanger.

6.7 Tipos de microorganismos encontrados

Tras la amplificación, purificación y secuenciación del ARNr 16S bacteriano o la región ITS fúngica se comenzó con la identificación microbiana de las UFC obtenidas en el medio selectivo para lactobacilos. Se realizaron comparaciones entre las regiones seleccionadas de las secuencias obtenidas y la información contenida en las bases de datos de ARNr 16S (RDP [86] y GenBank [87]) o en las bases de datos de ITS (UNITE [88] e ISHAM [66]) de acuerdo al caso.

Se determinó que de las 65 UFC obtenidas en el medio MRS, 31 UFC (48%) eran de origen bacteriano y 34 UFC (52%) de origen fúngico (gráfico 7). En la línea rosa se encontraron cuatro veces más hongos (32 UFC) que bacterias (8 UFC) y en la línea naranja se encontraron muchas más bacterias (23 UFC) que hongos (2 UFC). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre la cantidad de bacterias encontradas en la línea rosa y la línea naranja, ni entre las UFC fúngicas obtenidas en ambas líneas.

Gráfico 7. Comparación entre bacterias y hongos obtenidos en medio MRS a partir de las líneas rosa y naranja.

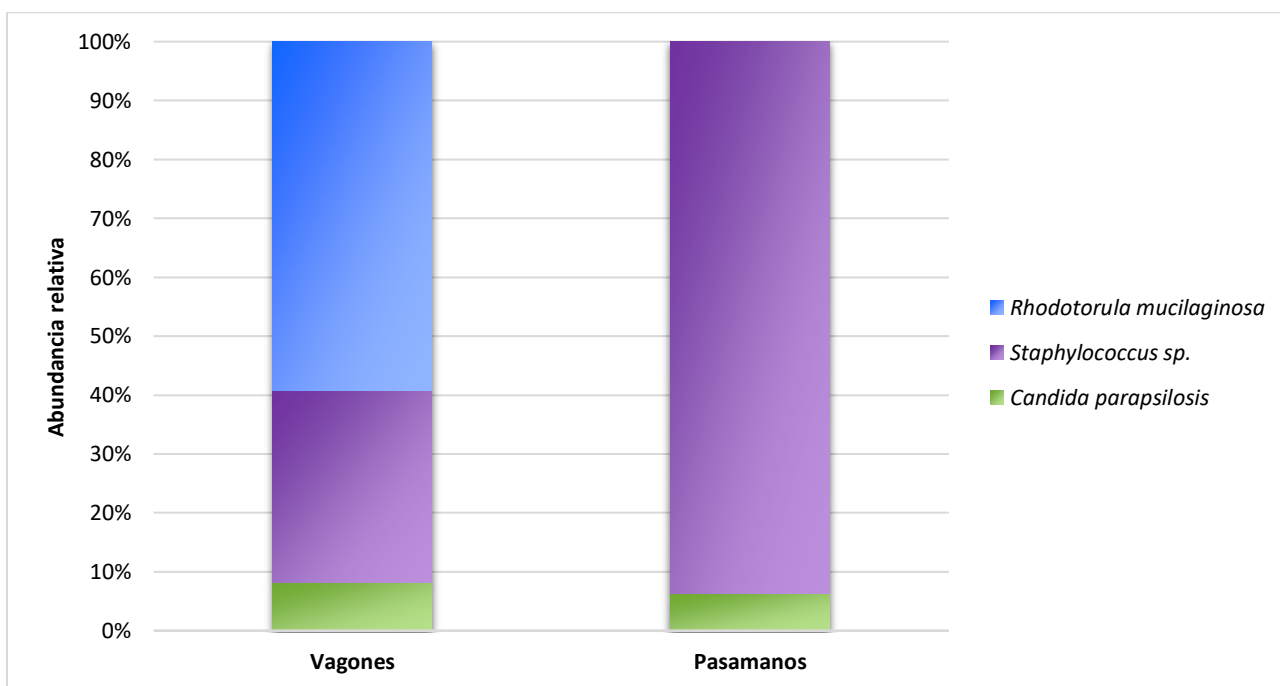


6.8 Identificación y abundancia relativa de microorganismos

A partir de la comparación entre los fragmentos seleccionados de las secuencias y la información reportada en las bases de datos para ARNr 16S o ITS consultadas, se determinó la presencia de 4 filotipos diferentes. Para propósitos de este trabajo se entiende como filotipo a un grupo de secuencias de un marcador genético que comparten un porcentaje de identidad superior al 97% [93]. Todas las secuencias analizadas presentaron al menos un 98% de identidad con respecto a organismos tipo.

Los filotipos identificados mediante la secuenciación de la región ITS fúngica son: *Rhodotorula mucilaginosa*, cuyas secuencias se corresponden con las UFC con morfología 1 (tabla 6) y *Candida parapsilosis*, que presentó las morfologías 3 y 4; de manera que es posible saber el porcentaje encontrado de estos filotipos entre el total de UFC obtenidas. Por el contrario, los dos filotipos bacterianos identificados (*Staphylococcus hominis* y *Staphylococcus epidermidis*) presentaron la misma morfología colonial (morfología 2), por lo que para los cálculos presentados a continuación se incluyen ambos filotipos dentro del grupo *Staphylococcus sp.*

Gráfico 8. Abundancia relativa de los microorganismos identificados en vagones y pasamanos del Metro.



En el gráfico 8 se muestran los resultados de abundancias relativas de los filotipos encontrados al interior de vagones y en los pasamanos de las dos líneas analizadas. En las muestras de vagones se encontraron presentes tres filotipos, siendo *R. mucilaginosa* el más abundante (59.2%), seguido de *Staphylococcus sp.* (32.7%) y finalmente *C. parapsilosis* (8.1%). En las muestras obtenidas de pasamanos sólo se encontró la presencia de dos filotipos: *Staphylococcus sp.* el más abundante (93.8%) y *C. parapsilosis* (6.2%).

En la línea rosa (gráfico 9) se encontraron tres filotipos en donde el 72.5% de las UFC pertenecían a *Rhodotorula mucilaginosa*, el 20% a *Staphylococcus sp.* y el 7.5% a *Candida parapsilosis*. En el caso de la línea naranja (gráfico 10) sólo se encontraron dos filotipos, de los cuales *Staphylococcus sp.* representó el 92% de las UFC y *Candida parapsilosis* el 8%.

Gráfico 9. Identificación microbiana en línea rosa.

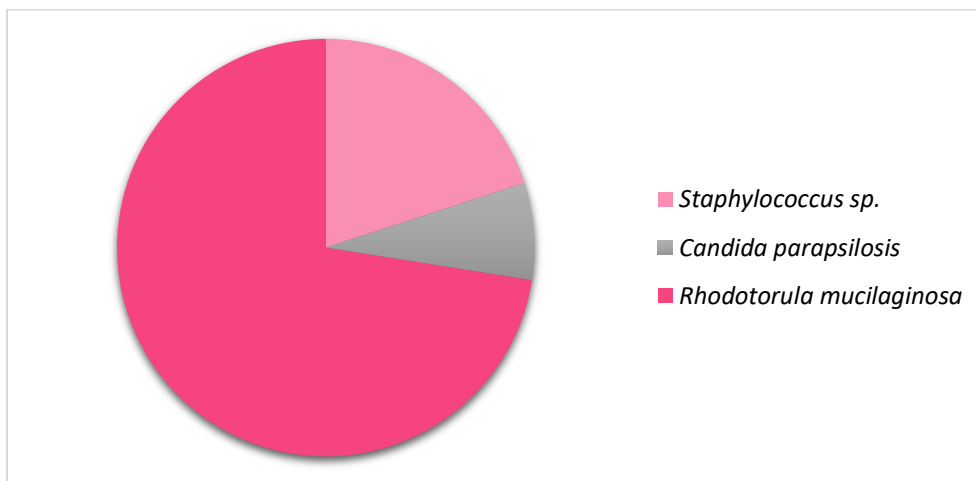
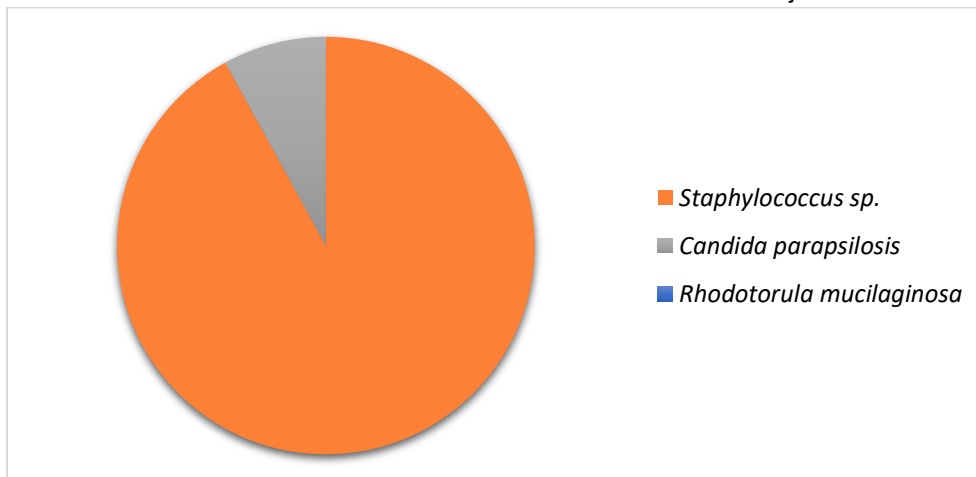


Gráfico 10. Identificación microbiana en línea naranja.



7) DISCUSIÓN

Entre los objetivos del estudio microbiológico del ambiente construido destaca la búsqueda del establecimiento de una línea base contra la que se puedan comparar las desviaciones y poder detectar posibles amenazas para la salud pública [45]. La urbanización ha llevado a la dependencia del transporte público, por lo que de los muchos tipos de espacios interiores, los subterráneos se han convertido en componentes indispensables de las grandes ciudades. El Sistema de Transporte Colectivo Metro (STCM) de la Ciudad de México (CDMX) es uno de los principales medios de transporte de esta urbe (moviliza a más de 4 millones de personas diariamente) y es un lugar donde los usuarios pasan una parte significativa de su tiempo.

El Metro es un espacio confinado que puede permitir la concentración de contaminantes de los ambientes exteriores o generados internamente, principalmente en las estaciones subterráneas. A pesar de esto, se sabe muy poco sobre la exposición microbiana de las personas al interior.

En este estudio se buscó la identificación y cuantificación de bacterias cultivables del género *Lactobacillus* a partir de muestras superficiales del Metro de la CDMX; así como su relación con factores ambientales como número de pasajeros, temperatura y porcentaje de humedad relativa. Los lactobacilos han sido relacionados tanto de forma benéfica como perjudicial con la salud humana, por lo que su presencia en un espacio cerrado y con elevada densidad de personas (como el Metro) puede ser de gran interés para el área de la salud pública. Los *Lactobacillus* son microorganismos nutricionalmente exigentes y requieren la presencia de diversos factores de crecimiento para su desarrollo en un medio de cultivo, por lo cual son incapaces de crecer en medio de cultivo general.

Aunque no se logró el aislamiento de *Lactobacillus*, si fue posible la caracterización de otros tipos de microorganismos cultivables en un medio de cultivo ácido (MRS).

Trabajos previos desarrollados en diversas partes del mundo han realizado la descripción de comunidades microbianas en medios de transporte subterráneos a partir de muestras aerotransportables [26-42,44] o muestras superficiales [43,45]. Hasta el momento de escritura

de esta tesis se tiene conocimiento de sólo un estudio publicado realizado en el STCM de la CDMX [42] cuyo objetivo fue la caracterización de las comunidades microbianas aerotransportables y cultivables empleando técnicas de identificación fenotípica, sin embargo, el trabajo aquí presentado ofrece un enfoque distinto debido a que se realizó la identificación de microorganismos cultivables obtenidos de muestras superficiales mediante técnicas de identificación molecular, así como la descripción del potencial patogénico de los microbios encontrados.

En las investigaciones previas llevadas a cabo en sistemas de transporte subterráneos [26-45] se reportan resultados diversos e incluso contradictorios en cuanto a la cantidad y diversidad microbiana encontradas. Estas discrepancias se atribuyen a diversos factores que van desde el muestreo y técnicas de análisis, hasta las características propias de cada infraestructura analizada (diseño, operación y mantenimiento). En consecuencia, la interpretación de resultados de este trabajo presenta dificultades debido a la información insuficiente y a la existencia de numerosas variables, por lo tanto, las comparaciones realizadas entre los resultados aquí presentados y la información reportada por otros investigadores deben tomarse con cautela.

7.1 Factores ambientales

La temperatura, la humedad y las actividades humanas se encuentran entre los principales factores que pueden modificar los biocontaminantes en espacios interiores y se encuentran interrelacionados.

a) Temperatura y humedad relativa

De manera general, se considera que la temperatura y la humedad dentro de los sistemas subterráneos son más altas y más estables que en el exterior [31,40].

La temperatura es una variable importante porque favorece la presencia de los microorganismos al tener un efecto sobre el metabolismo y la tasa de reproducción [42]. El aumento de la temperatura al interior de los subterráneos se relaciona principalmente con los

sistemas de ventilación. En diversos estudios [26,28,32,33,38,42,43] se ha encontrado que existe una mayor concentración y variabilidad de microorganismos entre más profunda se encuentre una estación, ya que la temperatura se ve aumentada debido a la mala ventilación y el confinamiento. En el Metro de la CDMX no se observó buena correlación entre la temperatura y la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) ($R^2 = 0.002$), situación que también ha sido observada en los subterráneos de Corea e Irán [33,38].

La humedad es uno de los factores más cruciales para la supervivencia de los microorganismos porque el movimiento de las moléculas de agua de los microorganismos depende de la temperatura y de la humedad. Mientras que algunos microorganismos sobreviven mejor en elevadas humedades relativas otros lo hacen mejor en bajas humedades relativas [28]. En estudios del Metro se han reportado tanto correlaciones positivas entre los microorganismos y la humedad relativa [27,30], como ausencia de correlación entre la concentración microbiana y las condiciones de humedad [33], por lo que el efecto de esta variable sobre las comunidades microbianas encontradas en subterráneos es controversial. En este trabajo se encontró que el mayor número de microorganismos se encontraron cuando se registraron porcentajes de humedad relativa intermedios (46% – 55%), pero no se observó buena correlación entre el número de UFC y la humedad relativa ($R^2 = 0.13$).

b) Presencia humana

Los estudios basados en la secuenciación de ADN microbiano han revelado que las comunidades microbianas del ambiente construido están fuertemente influenciadas por sus ocupantes humanos [45]. En ambientes interiores estas comunidades son generalmente dominadas por un pequeño número de géneros, lo que puede deberse a diversos factores (como condiciones ambientales, arquitectura y ubicación geográfica) siendo las fuentes antropogénicas las principales contribuyentes [37,40].

Las estaciones del Metro son por lo general ambientes subterráneos dentro de un espacio confinado y a veces están mal ventiladas y atestadas, lo que puede afectar negativamente la calidad del aire. El aire del subterráneo se compone por una gran cantidad de partículas sólidas y polvo cargado con microorganismos [40,44]. Las personas son una de las fuentes principales

de las partículas aerotransportables cargadas con microorganismos, por lo que la ocupación humana puede ser el factor más importante que afecte la cantidad y la estructura de las comunidades microbianas aerotransportables presentes en el Metro [29].

Se ha reportado una correlación positiva entre la cantidad y diversidad de las comunidades microbianas, y el número de personas presentes en el Metro. Las concentraciones de microorganismos generalmente muestran niveles aumentados durante las horas pico en comparación con las horas no pico, lo que sugiere que las personas juegan un papel importante en la introducción de microorganismos al sistema [27,28,30-32,35,37,38,41-43]. Por otra parte, en un estudio realizado en el Metro de Barcelona [44] se concluyó que las personas no son la principal fuente generadora de microorganismos al observar que la mayoría de los grupos microbianos más abundantes no se consideran parte de la microbiota humana (ni comensal ni patógena), sin embargo, dado que no se tomaron muestras durante las horas pico, se considera un resultado representativo de periodos de densidad humana de media a baja.

En esta investigación no se determinó una buena correlación entre el número de personas y la cantidad de microorganismos al interior del Metro de la CDMX ($R^2 = 0.06$), situación que también se encontró en un estudio realizado en el Metro de Corea [33].

7.2 Comunidades microbianas en superficies del Metro

Muchos microorganismos tienden a formar agregados con partículas de diversa naturaleza (polvo), por lo que pueden encontrarse en concentraciones mayores en el polvo depositado en superficies porque aumentan sus velocidades de sedimentación [26]. La presencia de desechos orgánicos en el polvo (escamas de la piel, cabello, fibras de ropa, restos de alimentos, etc.) generalmente proporcionan suficientes nutrientes para el crecimiento de diversos microorganismos. El contenido microbiano en el polvo se compone por células vivas y muertas [94].

El polvo puede considerarse como una muestra integrada por materia particulada originalmente aerotransportable y su deposición es uno de los mecanismos que contribuye al desarrollo de las comunidades microbianas en superficies de ambientes interiores [94]. En el

Metro, el aire generado por los sistemas de ventilación, el movimiento de los trenes y el desplazamiento de las personas promueve la resuspensión del polvo, de manera que la deposición y la resuspensión del polvo ocurren de manera simultánea en cualquier momento dado [31,42,94].

Se ha reportado una correlación negativa entre el efecto de un sistema de ventilación eficiente y las concentraciones de comunidades microbianas aerotransportables en el Metro [28,30,32,33,36,40,42,44]. Las estaciones con una ventilación adecuada (como las estaciones superficiales o las que cuentan con un sistema de ventilación mecánico) presentan concentraciones microbianas aerotransportables inferiores a las estaciones subterráneas o estaciones con ventilación ineficiente. Además, si la ventilación en el Metro es buena entonces las comunidades microbianas serán muy semejantes a las del exterior y bastante homogéneas a lo largo del sistema [32,36,39].

Ahora bien, dado que el polvo depositado en superficies es dinámico y está estrechamente relacionado con las partículas aerotransportables, es lógico pensar que si el Metro cuenta con un sistema de ventilación eficiente entonces disminuirá la concentración de microorganismos aerotransportables y por lo tanto también lo hará la cantidad de microorganismos depositados en las superficies.

En el trabajo realizado en el Metro de la CDMX se obtuvo mayor cantidad de UFC en los vagones que en los pasamanos de las dos líneas analizadas (rosa y naranja). Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas, la mayor cantidad de microorganismos encontrados al interior de los vagones se atribuye principalmente a dos factores: ventilación y presencia humana.

Los trenes de las líneas muestreadas cuentan con un sistema de ventilación mecánico. Cada vagón tiene instalados 7 ventiladores en el techo, sin embargo, la mayoría de las veces éstos no funcionan o lo hacen de manera inadecuada. Además, los trenes no cuentan con pasillos de intercomunicación por lo que el aire no fluye libremente al interior, de manera que la ventilación al interior de los vagones es realizada esencialmente por la apertura de las ventanas y el desplazamiento de los trenes a lo largo del túnel. En el caso de los pasamanos,

el tránsito constante de las personas genera aire que promueve la resuspensión del polvo, lo que disminuye la cantidad de microorganismos encontrados en dicho lugar.

Por otro lado, en este trabajo se encontraron buenas correlaciones entre el número de personas en el vagón y la temperatura ($R^2 = 0.69$) y el número de personas y la humedad relativa ($R^2 = 0.75$), lo que sugiere que las personas son los principales modificadores de las condiciones ambientales que tienen un mayor efecto sobre las comunidades microbianas en el Metro. Esta conjetura se apoya con la observación de un número mayor de UFC en los vagones de la línea rosa que en los vagones de la línea naranja. Aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de microorganismos encontrados en los vagones de ambas líneas, la desigualdad se debe probablemente a que la afluencia de personas es aproximadamente 2.5 veces mayor en la línea rosa que en la línea naranja.

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de UFC obtenidas con los dos medios de cultivo utilizados (general y MRS). Esto pone en evidencia la importancia del uso de múltiples medios de cultivo para revelar una estimación más real sobre la cantidad y diversidad de microorganismos cultivables, ya que se sabe que las técnicas dependientes de cultivo subestiman las concentraciones reales de microorganismos [95]. Además, el medio de cultivo general permite el crecimiento de microorganismos que no son nutricionalmente exigentes, mientras que el medio selectivo MRS promueve el crecimiento de microbios acidófilos y con exigencias nutricionales especiales, motivo por el cual se observaron tantas diferencias en las cantidades de UFC obtenidas en ambos medios.

7.3 Identificación microbiana en subterráneos

Las comunidades microbianas encontradas en sistemas subterráneos comprenden microorganismos tanto de seres humanos como del medio ambiente. En los trabajos realizados previamente se han encontrado combinaciones de comunidades microbianas derivadas del hombre, el suelo, el aire y el agua [26-45]. Los estudios realizados con muestras superficiales y técnicas independientes de cultivo [43,45] han reportado que las comunidades microbianas en subterráneos se derivan en gran parte de la piel humana y de los tractos gastrointestinal y urogenital.

Los principales grupos bacterianos detectados en los subterráneos son dominados generalmente por los miembros de sólo 4 de las ~100 phyla bacterianas conocidas: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. Las familias bacterianas con mayor abundancia relativa son *Staphylococcaceae* y *Corynebacteriaceae*; y los géneros bacterianos predominantes involucran a *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* [26,28-30,33,35-37,39-45].

Además, en todos los casos la proporción de bacterias Gram-positivas es mucho mayor que la de bacterias Gram-negativas (hasta > 90%). Se ha descrito que ambientes interiores en donde los seres humanos son la principal fuente de bacterias dominan las bacterias Gram-positivas, lo que indica superpoblamiento y ventilación inadecuada [28,30,35,41].

En el caso de los hongos se han encontrado predominantemente los géneros *Penicillium*, *Cladosporium* y *Aspergillus* en sistemas de transporte subterráneos [26-28,31,32,34-36,38,39,42,43,45].

En este estudio se buscó el aislamiento de bacterias del género *Lactobacillus* sin éxito alguno. Esto puede deberse a que se encuentran en muy bajas concentraciones en superficies del Metro, sin embargo, la no detección de la fracción viable no es prueba suficiente de la ausencia de dichos microorganismos. De acuerdo a un estudio metagenómico con muestras superficiales del metro de Boston [45] estas bacterias se encuentran con una abundancia relativa promedio <1% a lo largo de diferentes superficies y están presentes predominantemente en los respaldos de los asientos. En muestras aerotransportables se han detectado con una abundancia relativa < 0.6% [39].

En el Metro de la CDMX se encontraron las bacterias *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hominis*. Estos resultados coinciden con la información reportada [30,41,45] en donde *S. hominis* y *S. epidermidis* se encuentran entre las principales especies de estafilococos encontrados tanto en superficies como en muestras aerotransportables de los subterráneos.

En el caso de los hongos se identificaron las levaduras *Candida parapsilosis* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Generalmente las levaduras no se encuentran entre los hongos más abundantes encontrados en el subterráneo. La abundancia relativa de levaduras en muestras fúngicas aerotransportables en subterráneos se ha encontrado entre 2% y 7% [28,36,38]. En un estudio realizado en Egipto [28] se registró una abundancia relativa de *Candida* cercana a 0.1% en muestras aerotransportables. El género *Rhodotorula* no había sido descrito previamente en estudios del Metro.

A pesar de que se empleó un medio de cultivo selectivo para lactobacilos (MRS) se obtuvieron microorganismos diferentes a las bacterias esperadas. El medio MRS presenta un bajo grado de selectividad y permite el crecimiento de diversos microorganismos, particularmente si son resistentes a un pH ácido [96]. Aunque no se emplea de manera cotidiana, se ha descrito el uso de este medio de cultivo para el aislamiento de diversos géneros de *Staphylococcus* [97] y de *Candida* [98]. No se tiene conocimiento del uso del medio MRS para el aislamiento de *Rhodotorula*, sin embargo, esta levadura cuenta con diversos mecanismos que le permiten sobrevivir a condiciones de estrés [99].

7.4 Bacterias identificadas en superficies del Metro de la CDMX

El género *Staphylococcus* es un grupo muy heterogéneo de bacterias Gram-positivas que pertenecen a la familia *Staphylococcaceae* del phylum *Firmicutes*. Tienen forma de cocos, son aerobios o anaerobios facultativos, mesofílicos, no móviles y no esporulados. Se presentan típicamente en agrupaciones de racimos de uva [13,47].

Los estafilococos se consideran bacterias comensales en la piel y mucosas de humanos [25,100,101]. Son muy abundantes en las palmas de las manos [25]. *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hominis* son los estafilococos coagulasa-negativa más comunes de las superficies de las axilas, brazos y piernas [102].

a) *Staphylococcus epidermidis*

Esta bacteria forma parte de la microbiota normal de la piel, membranas de mucosas y tracto urogenital de humanos; pero también es un patógeno oportunista capaz de causar un amplio espectro de enfermedades especialmente en pacientes inmunocomprometidos [103,104]. Junto con *S. aureus*, ocupa el primer lugar entre los agentes causantes de las infecciones nosocomiales, principalmente asociado a la capacidad que tiene de formar biopelículas [104,105].

S. epidermidis es la especie más frecuentemente aislada del epitelio humano y coloniza predominantemente las axilas, la cabeza y las fosas nasales [104]. En la piel, esta especie es de importancia significativa porque está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis local [106].

El análisis del genoma de *S. epidermidis* mostró que esta bacteria posee genes que proporcionan protección contra diversas condiciones de estrés. Además, parece ser un reservorio de genes de resistencia a diversos antibióticos que puede transferir a *S. aureus* [104].

b) *Staphylococcus hominis*

S. hominis es una especie de *Staphylococcus* coagulasa-negativa asociado a piel y vías aéreas superiores en humanos. Es un patógeno oportunista principalmente en neonatos y pacientes inmunosuprimidos. Posee la capacidad de formar biopelículas [107].

7.5 Hongos identificados en superficies del Metro de la CDMX

Las levaduras son organismos eucariotas, unicelulares, con forma redonda a ovalada y diversidad en tamaños [47]. Las levaduras se encuentran comúnmente en la piel humana [108]. *Candida* y *Rhodotorula* son algunos de los géneros de hongos levaduriformes asociados a piel y que se encuentran comúnmente en ambientes interiores [94,108]. Algunas levaduras pueden

existir durante largos periodos de tiempo en un estado inactivo, lo que les permite resistir condiciones ambientales extremas [94,109].

c) *Candida parapsilosis*

El género *Candida* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae* del phylum *Ascomycota* [47]. Estos hongos han demostrado la capacidad de formar biopelículas y colonizar diversas superficies [110,111].

Las células de *Candida parapsilosis* exhiben formas ovales, redondas o cilíndricas. *C. parapsilosis* tiene una extensa distribución en la naturaleza y se ha aislado de animales domésticos, suelo y ambientes marinos [94,112]. Se considera comensal de la piel humana pero también ha sido identificada como patógena especialmente en condiciones de deficiencia inmunológica, diabetes o después del uso de antibióticos [47,101,112,113].

C. parapsilosis es uno de los hongos más frecuentemente aislados de las manos humanas y es la segunda especie de *Candida* más comúnmente aislada [47,110].

d) *Rhodotorula mucilaginosa* (sinónimo: *Rhodotorula rubra*)

El género *Rhodotorula* pertenece a la familia de *Sporidiobolaceae* del phylum *Basidiomycota* [114]. Estos hongos presentan la capacidad de formación de biopelículas, de colonizar superficies y de sobrevivir periodos largos de tiempo de forma inactiva [109,111].

Las especies de *Rhodotorula* son levaduras saprófitas que son capaces sobrevivir y crecer en muchas condiciones desfavorables. Pueden ser recuperadas de muchas fuentes ambientales, incluyendo humanos, animales y una gran variedad de alimentos y bebidas [94,99]. Se encuentran típicamente en plantas y suelo, aunque también se ha encontrado en la piel humana [94,109,113].

Rhodotorula mucilaginosa es un patógeno oportunista que puede causar enfermedad en individuos inmunocompetentes, inmunocomprometidos, personas tratadas con antibióticos de amplio espectro o sometidas a procedimientos médicos invasivos [99,113].

Las colonias de *R. mucilaginosa* en medio de cultivo exhiben una coloración de rosa a rojo [99]. En levaduras, la síntesis de carotenoides (pigmentos) funcionan como fotoprotectores y protegen contra el daño foto-oxidativo de la radiación solar UV [115].

Tabla 7. Enfermedades asociadas a los microorganismos encontrados en superficies del Metro de la CDMX.

Microorganismo	Enfermedades asociadas	Ref.
<i>S. epidermidis</i>	Bacteremia, septicemia, infecciones oculares, endocarditis, peritonitis, infecciones articulares, infecciones de hueso.	[47,103]
<i>S. hominis</i>	Bacteriemia, septicemia, endoftalmitis, endocarditis.	[102,107]
<i>C. parapsilosis</i>	Endoftalmitis, endocarditis, queratitis micótica, paroniquia, fungemia, meningitis, peritonitis, artritis, otomicosis, onicomosis, vulvovaginitis, infecciones del tracto urinario.	[47,112]
<i>R. mucilaginosa</i>	Fungemia, endocarditis, queratitis micótica, meningitis, meningoencefalitis, ventriculitis, infecciones oculares, peritonitis, dermatitis atópica, infecciones cutáneas, otitis, infecciones pulmonares.	[47,99,111, 114,116]

Todos los microorganismos encontrados en el Metro de la CDMX son considerados patógenos oportunistas y han sido asociados a diversas enfermedades en humanos. En la tabla 7 se encuentran las principales patologías que han sido relacionadas con la presencia de *S. epidermidis*, *S. hominis*, *C. parapsilosis* o *R. mucilaginosa*. Sin embargo, es importante mencionar que la detección y clasificación de un organismo patógeno depende de muchos factores. Estos factores incluyen: dosis infecciosa, estado inmunológico del huésped, vía de transmisión, otras especies competitivas, métodos de identificación de microorganismos, transferencia horizontal, presencia de factores de virulencia, entre otros [117].

7.6 Presencia microbiana en el Metro de la CDMX

La presencia de los microorganismos cultivables encontrados en superficies del Metro de la CDMX se atribuye principalmente a la capacidad que presentan de formar biopelículas. Se estima que el 95% de los microorganismos encontrados en la naturaleza se encuentran

formando biopelículas [111]. Tanto hongos como bacterias se encuentran en biopelículas de forma natural porque es un mecanismo de supervivencia [100,111,118].

Una biopelícula es una aglomeración multicelular de microorganismos que presenta una arquitectura característica recubierta por una matriz polimérica extracelular hidratada [103,107,118]. La presencia de biopelículas ayuda a los microorganismos a adherirse mejor a la superficies y proporciona resistencia contra antimicrobianos, mecanismos de defensa del huésped y factores nocivos como la radiación UV o la deshidratación [94,103,104,107,111].

La expresión génica de las biopelículas se induce como respuesta a factores de estrés (inanición, estrés térmico, elevada osmolaridad, algunos antimicrobianos, acumulación de metabolitos, estrés oxidativo, gradientes de pH, entre otros) [119]. El desarrollo de biopelículas en levaduras es similar al de las bacterias, en ambos casos se encuentran las fases de formación: adherencia, formación de microcolonia, maduración, mantenimiento y dispersión [120].

Todas las investigaciones realizadas en subterráneos (incluyendo el presente) reportan un alto nivel de grupos microbianos asociados con la microbiota de la piel humana [26-45]. Varias regiones anatómicas corporales (como la cavidad oral y la región genitourinaria) pueden actuar como importantes donadores de microorganismos, sin embargo, la piel humana es la más importante en términos cuantitativos [94].

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y sirve tanto de barrera protectora contra la invasión por microorganismos patógenos como de hogar para la microbiota comensal. Diferentes factores del huésped y factores ambientales determinan las comunidades bacterianas y fúngicas residentes dependiendo de las propiedades fisiológicas de la piel [101,113,121]. En general, la piel es fresca, seca y ácida (pH ~5); pero presenta una variedad de ecosistemas, incluyendo regiones con una amplia gama de pH, temperatura, humedad y contenido lipídico [101].

Se calcula que los humanos llevan 10^{12} microorganismos en su epidermis [122]. El descamamiento de millones de células epiteliales cargadas con microorganismos contribuye y

modifica en gran medida las comunidades microbianas presentes en el ambiente construido, especialmente en ambientes mal ventilados o muy ocupados [19,94] como el Metro de la CDMX.

En la línea rosa del Metro de la CDMX se encontraron 4 veces más hongos que bacterias en medio de cultivo ácido. Este resultado es opuesto a lo que se pudiera esperar ya que tanto *S. epidermidis* como *S. hominis* se consideran comensales de la piel humana y debido a que la densidad humana en la línea rosa es mucho mayor que en la línea naranja sería más lógico encontrar mayor cantidad de microorganismos asociados a humanos en la línea rosa. Esta discrepancia puede deberse a que el flujo de personas en la línea rosa es tan elevado que promueven la resuspensión de los microorganismos superficiales, sin embargo, hacen falta más estudios al respecto para corroborar esta hipótesis.

La diferencia principal que se observa entre los microorganismos encontrados tanto al interior de vagones o en pasamanos, como entre las líneas analizadas, se debe a *Rhodotorula mucilaginosa*. Este hongo es un microorganismo asociado principalmente a suelos, por lo que su presencia al interior del Metro probablemente se debe a que las personas funcionan como vector de transferencia y arrastran a dichas levaduras desde el exterior en los zapatos principalmente. Además, al encontrarse asociada con partículas de suelo, es razonable que sea menos abundante en superficies donde es menos probable que se asiente el polvo. Se cree que por este motivo no fue posible su aislamiento en pasamanos, en donde las constantes corrientes de aire evitan el asentamiento del polvo, a diferencia de los vagones, en donde el movimiento de aire es menor por la mala ventilación. La razón por la que este hongo se observa tan abundantemente en la línea rosa (72.5%) y ausente en la línea naranja se atribuye a la profundidad de la línea. La línea naranja está más profunda que la línea rosa, por lo que es más probable que los microorganismos arrastrados desde el exterior sean desprendidos a menor profundidad.

7.7 Comparación entre los estudios realizados en el Metro de la CDMX

Además del estudio publicado por Hernández y cols [42], de manera paralela al trabajo aquí presentado se desarrolló una investigación realizada por González [123], estudiante de licenciatura de la carrera de Biología Molecular en la Universidad Autónoma Metropolitana.

El grupo de Hernandez trabajó con muestras aerotransportables y realizó la identificación de hongos y bacterias mediante técnicas dependientes de cultivo e identificación fenotípica. En dicho trabajo al igual que los resultados aquí presentados se encontró que la concentración de microorganismos se correlaciona positivamente con la temperatura y con la cantidad de personas, y que la cantidad de microorganismos encontrados en pasillos es menor que en los vagones debido al flujo constante de personas que promueve la resuspensión de partículas aerotransportables.

González por otro lado, trató de identificar y comparar si existen diferencias entre las bacterias cultivables encontradas en superficies de vagones exclusivos de mujeres y vagones generales de las líneas rosa y naranja. Para ello utilizó el mismo medio de cultivo general empleado en este estudio (veáse el punto 5.2) y tras el conteo y la descripción morfológica de las UFC encontradas, seleccionó 30 colonias diferentes que posteriormente fueron identificadas mediante técnicas moleculares.

A diferencia de lo que se reporta en el trabajo aquí presentado, González encontró muchas más UFC en la línea naranja que en la línea rosa (> 3.5 veces), lo que atribuye principalmente a la temperatura más que a la ocupación de personas, sin embargo, tampoco es clara la relación entre las condiciones ambientales al interior del metro y la cantidad de microorganismos encontrados en superficies.

Aunque no logró la identificación de microorganismos cultivables que fueran diferenciales entre hombres y mujeres al interior del Metro, los tipos de microorganismos descritos en dicho trabajo coinciden con lo reportes previos realizados en subterráneos. Se encontraron bacterias de las phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*; así como los géneros bacterianos más abundantes *Staphylococcus* y *Micrococcus* [123].

En el presente trabajo se logró la caracterización de microorganismos cultivables mesófilos, aerobios o anaerobios facultativos y con resistencia a diversas condiciones de estrés (presencia de antimicrobianos y bajo pH principalmente). Si los microbios que se desprenden de la piel (o residen en las células de la piel desprendidas) dominan las superficies de sistemas subterráneos de transporte masivo, es importante determinar si estos microorganismos son viables o se encuentran en crecimiento activo. También es fundamental saber si estos microorganismos pueden ser transferidos de forma estable de un individuo a otro. Todos los microorganismos encontrados en el Metro de la CDMX son patógenos oportunistas, sin embargo, hacen falta estudios de susceptibilidad antimicrobiana y búsqueda de factores de virulencia para determinar el peligro que representan para los usuarios del Metro, especialmente para aquellas personas con predisposición al desarrollo de alguna enfermedad asociada a estos microorganismos.

8) CONCLUSIONES

- a) No fue posible la identificación de bacterias del género *Lactobacillus* en las superficies del Metro de la CDMX porque posiblemente la técnica empleada no es lo suficientemente sensible para detectarlas. Se propone probar con técnicas de identificación microbiana independientes de cultivo para lograr dicho objetivo.
- b) A partir de las UFC obtenidas en el medio de cultivo selectivo (MRS) y la posterior extracción de ADN, se logró la identificación de hongos y bacterias mediante el empleo de técnicas moleculares y herramientas de bioinformática.
- c) En las superficies del Metro de la CDMX se identificaron dos filotipos bacterianos (*Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hominis*) y dos filotipos levaduriformes (*Candida parapsilosis* y *Rhodotorula mucilaginosa*). Aunque no fue posible relacionar de manera clara la cantidad de estos microorganismos con las condiciones ambientales (temperatura y %HR) encontradas al interior del Metro, si fue posible determinar que las personas son las responsables principales de su presencia en las superficies del subterráneo.
- d) El presente trabajo aporta información nueva al describir por primera vez la presencia de *Rhodotorula* en un sistema de transporte subterráneo.
- e) Aunque los microorganismos encontrados al interior del Metro de la CDMX se consideran patógenos oportunistas no se pueden extraer conclusiones con respecto a los riesgos que representan para la salud de los usuarios hasta realizar más estudios.

9) REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, (2015). *Número de habitantes*. [en línea] Disponible en: <<http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/habitantes.aspx?tema=P>> Fecha de acceso: 18/Feb/2017.
2. Fideicomiso para el Mejoramiento de las Vías de Comunicación del Distrito Federal, (2003). *Diagnóstico de la movilidad de las personas en la Ciudad de México*. [en línea] Disponible en: <<http://www.fimevic.df.gob.mx/problemas/1diagnostico.htm>> Fecha de acceso: 18/Feb/2017.
3. ONU-Hábitat, (2015). *Reporte Nacional de Movilidad Urbana en México 2014-2015*. [en línea] Disponible en: <<http://www.onuhabitat.org/Reporte%20Nacional%20de%20Movilidad%20Urbana%20en%20Mexico%202014-2015%20-%20Final.pdf>> Fecha de acceso: 18/Feb/2017.
4. Instituto de Políticas para el Transporte y el Desarrollo, (2012). *Transporte Público Masivo en la Zona Metropolitana del Valle de México. Proyecciones de demanda y soluciones al 2024*. [en línea] Disponible en: <<http://mexico.itdp.org/wp-content/uploads/ResumenEjecutivoZMVM.pdf>> Fecha de acceso: 18/Feb/2017.
5. Sistema de Transporte Colectivo Metro de la Ciudad de México, (2017). [en línea] Disponible en: <<http://www.metro.cdmx.gob.mx>> Fecha de acceso: 18/Feb/2017.
6. Sistema de Transporte Colectivo Metro de la Ciudad de México, (2014). *El Metro es de todos*. 1° edición. México: Imprenta de Medios, S.A. de C.V.
7. King, G., (2014). *Urban microbiomes and urban ecology: How do microbes in the built environment affect human sustainability in cities?*. Journal of Microbiology. 52(9), 721-728.
8. Human Microbiome Project (NIH), (2008). *About the HMP*. [en línea] Disponible en: <<http://hmpdacc.org/overview/about.php>> Fecha de acceso: 18/Feb/2017.
9. National Human Genome Research Institute (NIH), (2011). *Whole genome association studies*. [en línea] Disponible en: <<https://www.genome.gov/17516714/>> Fecha de acceso: 7/Mar/2017.
10. Costello, E., et al., (2009). *Bacterial community variation in human body habitats across space and time*. Science. 326(5960), 1694-1697.
11. HMP Consortium, (2012). *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. Nature. 486(7402), 207-214.
12. Boon, E., et al., (2014). *Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes*. FEMS Microbiology Reviews. 38(1), 90-118.
13. Tortora, G., et al., (2016). *Microbiology. An introduction*. 12° edición. EUA: Pearson Education.
14. Klepeis, N., et al., (2001). *The National Human Activity Pattern Survey (NHAPS): a resource for assessing exposure to environmental pollutants*. Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology. 11(3), 231-252.
15. Kembel, S., et al., (2014). *Architectural design drives the biogeography of indoor bacterial communities*. PLoS ONE. 9(1), e87093.
16. Kembel, S., et al., (2012). *Architectural design influences the diversity and structure of the built environment microbiome*. The ISME Journal. 6(8), 1469-1479.
17. Flores, G., et al., (2011). *Microbial biogeography of public restroom surfaces*. PLoS ONE. 6(11), e28132.

18. Meadow, J., *et al.*, (2014). *Bacterial communities on classroom surfaces vary with human contact*. *Microbiome*. 2(1), 1-7.
19. Prussin A. & Marr, L., (2015). *Sources of airborne microorganisms in the built environment*. *Microbiome*. 3(78),1-10.
20. Luongo, J., *et al.*, (2016). *Microbial analyses of airborne dust collected from dormitory rooms predict the sex of occupants*. *Indoor Air*. 27(2), 338-344.
21. Jaffal, A., *et al.*, (1997). *Residential indoor airborne microbial populations in the United Arab Emirates*. *Environment International*. 23(4), 529-533.
22. Kelley, S. & Gilbert, J., (2013). *Studying the microbiology of the indoor environment*. *Genome Biology*. 14(2), 202.
23. Meadow, J., *et al.*, (2015). *Humans differ in their personal microbial cloud*. *PeerJ*. 3:e1258.
24. Flores, G., *et al.*, (2013). *Diversity, distribution and sources of bacteria in residential kitchens*. *Environmental Microbiology*. 15(2), 588-596.
25. Fierer, N., *et al.*, (2010). *Forensic Identification using skin bacterial communities*. *PNAS*. 107(14), 6477-6481.
26. Gilleberg, S., *et al.*, (1998). *A preliminary survey of aerial biocontaminants at six London underground stations*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41(2), 149-152.
27. Picco, A. & Rodolfi, M. (2000). *Airborne fungi as biocontaminants at two Milan underground stations*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 45(1-2), 43-47.
28. Awad, A. (2002). *Environmental study in subway metro stations in Cairo, Egypt*. *Journal of Occupational Health*. 44(2), 112-118.
29. Birenzvige, A., *et al.*, (2003). *Aerosol characteristics in a subway environment*. *Aerosol Science and Technology*. 37(3), 210-220.
30. Seino, K., *et al.*, (2005). *An evidential example of airborne bacteria in a crowded, underground public concourse in Tokyo*. *Atmospheric Environment*. 39(2), 337-341.
31. Ho, J., *et al.*, (2006). *Temporal variation of airborne fungi concentrations and related factors in subway stations in Seoul, Korea*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 209(3), 249-255.
32. Bogomolova, E. & Kirtsideli, I., (2009). *Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg Underground railway system*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63(2), 156-160.
33. Hwang S., *et al.*, (2010). *Assessment of airborne environmental bacteria and related factors in 25 underground railway stations in Seoul, Korea*. *Atmospheric Environment*. 44(13), 1658-1662.
34. Kawasaki, T., *et al.*, (2010). *Distribution and identification of airborne fungi in railway stations in Tokyo, Japan*. *Journal of Occupational Health*. 52(3), 186-193.
35. Dong, S. & Yao, M., (2010). *Exposure assessment in Beijing, China: biological agents, ultrafine particles, and lead*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 170(1-4), 331-343.
36. Kim, K., *et al.*, (2011). *Exposure level and distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in Seoul metropolitan subway stations*. *Industrial Health*, 49(2), 242-248.
37. Dybwad, M., *et al.*, (2012). *Characterization of airborne bacteria at an underground subway station*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(6), 1917-1929.

38. Hoseini, M., et al., (2013). *Concentration and distribution characteristics of airborne fungi in indoor and outdoor air of Tehran subway stations*. *Aerobiologia*, 29(3), 355-363.
39. Robertson, C., et al., (2013). *Culture-independent analysis of aerosol microbiology in a metropolitan subway system*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(11), 3485-3493.
40. Leung, M., et al., (2014). *Indoor-air microbiome in an urban subway network: Diversity and dynamics*. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(21), 6760-6770.
41. Dybwad, M., et al., (2014). *Temporal variability of the bioaerosol background at a subway station: Concentration level, size distribution, and diversity of airborne bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(1), 257-270.
42. Hernández, C., et al., (2014). *Aerobiological study in the Mexico City subway system*. *Aerobiologia*. 30(4), 357-367.
43. Afshinnekoo, E., et al., (2015). *Geospatial resolution of human and bacterial diversity with city-scale metagenomics*. *Cell Systems*. 1(1), 72-87.
44. Triadó, X., et al., (2016). *Bioaerosols in the Barcelona subway system*. *Indoor Air*. 27(3), 564-575.
45. Hsu, T., et al., (2016). *Urban transit system microbial communities differ by surface type and interaction with humans and the environment*. *Applied and Environmental Science*. 1(3), 1-18.
46. Szám L., et al. (1980). *Airborne microflora found in some stations of the metro in the Hungarian capital of Budapest*. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 170(1), 199-208.
47. Tille, P., et al., (2014). *Bailey & Scotts. Diagnostic Microbiology*. 13° edición. China: Elsevier
48. Md, F. & Shahnewaj K., (2013). *Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments*. *Ceylon Journal of Science*. 42(1), 19-33.
49. Canadian Food Inspection Agency, (2016). *Identification and taxonomic classification of microorganism(s) represented for use as supplements under the Fertilizers Act*. [en línea] Disponible en: <<http://www.inspection.gc.ca/plants/fertilizers/registration-requirements/taxonomic-classification/eng/1346524491267/1346527009874>> Fecha de acceso: 27/Mar/2017.
50. Donelli, G., et al., (2013). *Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism*. *Microbial Ecology in Health & Disease*. 24(1), 1-8.
51. Castro, G., et al., (2015). *Identification and typing methods for the study of bacterial infections: A brief review and mycobacterial as case of study*. *Archives of Clinical Microbiology*. 7(1), 1-10
52. Bisen, P., et al., (2012). *Microbes: Concepts and applications*. 1° edición. EUA: John Wiley & Sons. Cap: 4.
53. Rodicio, R. & del Carmen, M., (2004). *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(4), 238-245.
54. Klug, W., et al., (2006). *Conceptos de genética*. 8° edición. España: Pearson.
55. Madigan, M., et al., (2015). *Brock biology of microorganisms*. 14° edición. EUA: Pearson.
56. Fox, G., (2010). *Origin and evolution of the ribosome*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2(9), a003483.

57. Henras, A., *et al.*, (2015). *An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes*. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 6(2), 225-242.
58. Lodish, H., *et al.*, (2000). *Molecular Cell Biology*, 5° edición. EUA: W.H. Freeman and Company.
59. Woese, C., (1987). *Bacterial evolution*. Microbiological Reviews. 51(2), 221-271.
60. Spiegelman D., *et al.*, (2005). *A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities*. Canadian Journal of Microbioloy. 51(5), 355-386.
61. Janda, J. & Abbott, S., (2007). *16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls*. Journal of Clinical Microbiology. 45(9), 2761-2764.
62. Wahl, B., *et al.*, (2015). *GATC's INVIEW MICROBIOME Profiling 2.0 - HighThroughput Microbiome Sequencing Using Illumina's MiSeq*. [en línea] Disponible en: <https://www.gatc-biotech.com/shop/fr/amfilerating/file/download/file_id/58> Fecha de acceso: 18/Abr/2017
63. Petti, C., (2007). *Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing*. Clinical Infectious Diseases. 44(8), 1108-1114.
64. Schoch, C., *et al.*, (2012). *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. PNAS. 109(16), 6241-6246.
65. Op De Beeck, M., *et al.*, (2014). *Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies*. PLoS ONE. 9(6): e97629.
66. Irinyi, L., *et al.*, (2015). *International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM) – ITS reference DNA barcoding database – the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi*. Medical Mycology. 53(4), 313-337.
67. Winnebeck, E., *et al.*, (2010). *Why does insect RNA look degraded?*. Journal of Insect Science, 10(159), 1-7.
68. Rahman, M., *et al.*, (2013.). *Polymerase Chain Reaction (PCR): A short review*. Anwer Khan Modern Medical College Journal. 4(1), 30-36.
69. Garibyan, L., & Avashia, N., (2013). *Polymerase Chain Reaction*. Journal of Investigative Dermatology, 133(3), e6.
70. Metzker, M., (2010). *Sequencing technologies – the next generation*. Nature Reviews Genetics. 11(1), 31-46.
71. Sanger, F., *et al.*, (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. PNAS. 74(12), 5463-5467.
72. Hutchison, C., (2007). *DNA sequencing: bench to bedside and beyond*. Nucleic Acids Research. 35(18), 6227-6237.
73. Metzker, M., (2005). *Emerging technologies in DNA sequencing*. Genome research. 15(12), 1767-1776.
74. Adams, J., (2008). *DNA sequencing technologies*. Nature Education. 1(1), 193.
75. Watson, J., *et al.*, (2014). *Molecular biology of the gene*. 7° edición. EUA: Pearson Education.
76. Lamont, R., *et al.*, (2011). *The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques*. BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 188(5), 533-549.
77. Salminen, M., *et al.*, (2004). *Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic L. Rhamnosus GG*. Clinical Infectious Diseases. 38(1), 62-69.

78. Cannon, J., *et al.*, (2005). *Pathogenic relevance of Lactobacillus: a retrospective review of over 200 cases*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 24(1), 31-40.
79. Fierer, N., *et al.*, (2008). *The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria*. PNAS. 105(46), 17994-17999.
80. Muizzuddin, N., *et al.*, (2012). *Physiological effect of a probiotic on skin*. Journal of Cosmetic Science. 63(6), 385-395.
81. Kober, M., & Bowe, W., (2015). *The effect of probiotics on immune regulation, acne, and photoaging*. International Journal of Women's Dermatology. 1(2), 85-89.
82. De Man, J., *et al.*, (1960). *A medium for the cultivation of lactobacilli*. Journal of Applied Microbiology. 23(1), 130-135.
83. Vos P., *et al.*, (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 3: The Firmicutes. 2° edición. EUA: Springer.
84. Weisburg, W., *et al.*, (1991). *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. Journal of Bacteriology. 173(2), 697-703.
85. White, T., *et al.*, (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 315-322
86. Cole, J., *et al.*, (2013). *Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis*. Nucleic Acids Research. 42(D), 633-642.
87. Benson, D., *et al.*, (2013). *GenBank*. Nucleic Acids Researc. 41(D), 36-42.
88. Abarenkov, K., *et al.*, (2010). *The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives*. New Phytologist. 186(2), 281-285.
89. Pearson, K., (1895). *Note on Regression and Inheritance in the Case of Two Parents*. Proceedings of the Royal Society of London. 58(1), 240-242.
90. Lilliefors, H., (1967). *On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown*. Journal of the American Statistical Association, 62(318), 399-402.
91. Student (Gosset, W.), (1908). *The probable error of a mean*. Biometrika. 6(1), 1-25.
92. Mann, H. & Whitney, D., (1945). *On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other*. The Annals of Mathematical Statistics 18(1), 50-60.
93. Nguyen, N., *et al.*, (2016). *A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity*. Nature Partner Journals. Biofilms and Microbiomes. 2(1), 1-8.
94. Rintala, H., *et al.*, (2012). *Microbial communities associated with house dust*. Advances in Applied Microbiology. 78(1), 75-120.
95. Pace, N., (1997). *A molecular view of microbial diversity and the biosphere*. Science. 276(5313), 734-740.
96. Sigma-Aldrich, (2017). *MRS Broth modified, Vegitone*. [en línea] Disponible en: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/38944?lang=es®ion=MX>> Fecha de acceso: 18/Abr/2017.
97. Heikkilä, M. & Saris, P., (2003). *Inhibition of Staphylococcus aureus by the comensal bacteria of human milk*. Journal of Applied Microbiology. 95(1), 471-478.

98. Parolin, C., *et al.*, (2015). *Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti – Candida activity*. PLoS ONE. 10(6), e0131220.
99. Deligios, M., *et al.*, (2015). *Draft genome sequence of Rhodotorula mucilaginosa, an emergent opportunistic pathogen* Genome announcements. 3(2), e00201-15.
100. Tristan, A., *et al.*, (2006). *Biology and pathogenicity of staphylococci other than Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*. Gram-Positive Pathogens. 572-586.
101. Grice, E. & Segre, J., (2011). *The skin microbiome*. Nature Reviews. Microbiology. 9(4), 244-253.
102. Zhang, L., *et al.*, (2013). *Multilocus sequence typing and further genetic characterization of the enigmatic pathogen, Staphylococcus hominis*. PLoS ONE. 8(6), e66496.
103. Szczuka, E., *et al.*, (2015). *Biofilm formation by Staphylococcus hominis strains isolated from human clinical specimens*. Folia microbiologica. 60(1), 1-5.
104. Otto, M., (2009). *Staphylococcus epidermidis – the ‘accidental’ pathogen*. Nature Reviews. Microbiol. 7(8), 555-567.
105. Uckay, I, *et al.*, (2009). *Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis*. Annals of Medicine. 41(2), 109-119.
106. Büttner, H., *et al.*, (2015). *Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular Interactions*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 5(14), 1-14.
107. Mendoza, S., *et al.*, (2015). *Antibiotic susceptibility of biofilm cells and molecular characterisation of Staphylococcus hominis isolates from blood*. PLoS ONE. 10(12), e0144684.
108. Yamamoto, N., *et al.*, (2015). *Indoor emissions as a primary source of airborne allergenic fungal particles in classrooms*. Environmental Science & Technology. 49(8), 5098-5106.
109. Glushakova, A., *et al.*, (2004). *Groups and sources of yeasts in house dust*. Mikrobiologija. 73(1), 111-117.
110. Silva, S., *et al.*, (2012). *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance*. FEMS Microbiology Reviews. 36(2), 288-305.
111. De Cássia, J., *et al.*, (2014). *Highlights in pathogenic fungal biofilms*. Revista Iberoamericana de Micología. 31(1), 22-29.
112. Trofa, D., *et al.*, (2008). *Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen*. Clinical Microbiology Reviews. 21(4), 606-625.
113. Findley, K., *et al.*, (2013). *Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin*. Nature. 498(7454), 367-370.
114. Tsiodras, S., *et al.*, (2014). *Rhodotorula mucilaginosa associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review*. Medical Mycology Case Reports. 10(6), 46-50.
115. Moliné, M., *et al.*, (2010). *Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast Rhodotorula mucilaginosa: the role of torularhodin*. Photochemical and Photobiological Sciences. 9(8), 1145-1151.
116. Arzumanyan, V., *et al.*, (2000). *Yeasts fungi in patients with allergic diseases: species variety and sensitivity to antifungal drugs*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 129(6), 601-604.
117. Smillie, C., *et al.*, (2011). *Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome*. Nature. 480(7376), 241-244.

118. Busscher, H. & Van der Mei, H., (2012). *How do Bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state?*. PLoS Pathogens. 8(1), e1002440.
119. Kırmusaoğlu, S., (2016). *Staphylococcal biofilms: Pathogenicity, mechanism and regulation of biofilm formation by quorum – sensing system and antibiotic resistance mechanisms of biofilm – embedded microorganisms*. Microbial Biofilms. Importance and application. 189-209.
120. Gattlen, J., et al., (2011). *Biofilm formation by the yeast Rhodotorula mucilaginosa: process, repeatability and cell attachment in a continuous biofilm reactor*. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research. 29(7), 979-991.
121. Rosenthal, M., et al., (2011). *Skin microbiota: Microbial community structure and its potential association with health and disease*. Infection, Genetics and Evolution. 11(5), 839-848.
122. Luckey T., (1972). *Introduction to intestinal microecology*. The American Journal of Clinical Nutrition. 25(12), 1292-1994.
123. González, C., (2017). *Análisis y comparación del microbioma de las líneas 1 y 7 del Metro de la Ciudad de México a partir de la secuencia del rRNA 16S; diferencias en relación a los vagones exclusivos de mujeres y los vagones generales*. (sin publicar).