

ELABORACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MUESTREO QUE PERMITA EVALUAR LA CALIDAD
MICROBIOLÓGICA DEL AIRE PARA EL LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUAS Y ALIMENTOS
DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.

ALEJANDRA MARÍA HERNÁNDEZ LÓPEZ
ANDRÉS FELIPE MARÍN RAMÍREZ

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2013

ELABORACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MUESTREO QUE PERMITA EVALUAR LA CALIDAD
MICROBIOLÓGICA DEL AIRE PARA EL LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUAS Y ALIMENTOS
DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.

TRABAJO DE GRADO
Requisito final para optar al título de Tecnólogo Químico

Director
Q.I. CARLOS HUMBERTO MONTOYA NAVARRETE

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2013

NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

ELABORACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MUESTREO QUE PERMITA EVALUAR LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AIRE PARA EL LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUAS Y ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.

Presentado por

**ALEJANDRA MARÍA HERNÁNDEZ LÓPEZ
ANDRÉS FELIPE MARÍN RAMÍREZ**

Los suscritos, director y jurados del presente trabajo de grado, una vez realizada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar:

La nota de _____

Con la connotación de _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy:

Director:

Carlos Humberto Montoya Navarrete _____

Jurado:

DEDICATORIA

A mi Madre por ser mi mayor ejemplo a seguir, una mujer que a pesar de los obstáculos que le puso la vida, logró salir adelante con gran esfuerzo y dedicación.

Alejandra María Hernández López

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. A mi familia por ayudar a construir la persona que soy hoy, y a todas aquellas personas que han hecho parte de mi vida, y que han sembrado en mí semillas que hoy están dando sus primeros frutos.

Gracias a todos.

Andrés Felipe Marín Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión de la Universidad Tecnológica de Pereira, por el apoyo económico brindado que hizo posible la completa ejecución del proyecto de grado.

Agradecemos al Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, por permitirnos desarrollar este proyecto, que esperamos sea de utilidad para el mismo.

Agradecemos a nuestro director de trabajo de grado Q.I. Carlos Humberto Montoya Navarrete, por su incondicional apoyo y direccionamiento en el transcurso, no solo del presente trabajo, sino a lo largo de nuestra carrera.

Agradecemos a las Microbiólogas Ligia Esperanza Gelvez, y Giselly Dimary Pérez por su asesoría y apoyo en la elaboración de este trabajo de grado.

Agradecemos a las personas que nos permitieron realizar los muestreos en sus establecimientos comerciales, y que por políticas internas sus nombres no serán publicados.

Agradecemos al Semillero de Suelos GEA (Grupo de Estudio Agrícola), por brindarnos su colaboración cuando la necesitamos.

Agradecemos a Javi y a Mancho por su paciencia, colaboración y por el valioso trabajo que desempeñan dentro de la Escuela de Química.

Y por último pero no menos importante, queremos agradecer a todos nuestros amigos por su apoyo, compañía, buenos consejos y por estar siempre con una palabra de aliento cuando lo hemos necesitado.

Gracias a todas las personas que de alguna manera participaron en la elaboración de este lindo proyecto, y que nos permitieron dar un paso más en el camino hacia éxito.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
1. RESUMEN	14
2. JUSTIFICACIÓN.	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	16
4. OBJETIVOS.	17
4.1. Objetivo general.	17
4.2. Objetivos específicos.	17
5. ANTECEDENTES.	18
5.1. Desarrollo histórico de la microbiología del aire.	18
6. MARCO TEÓRICO.	20
6.1. Las bacterias	20
6.2. Bacterias patógenas	21
6.3. El aire y las bacterias	22
6.4. Los hongos	22
6.5. El aire y los hongos	23
6.6. Factores que contribuyen a la permanencia de los microorganismos en el aire.	24
6.6.2. Temperatura.	24
6.6.3. Oxígeno	25
6.6.4. Materia orgánica.	25
6.6.5. Ventilación.	25
6.6.6. Polvo.	25
6.7. Microorganismos de interés para el protocolo.	26
6.7.1. <i>Escherichia coli</i> .	27
6.7.1.1. Historia.	27
6.7.1.2. Taxonomía.	27
6.7.1.3. Síntomas.	27
6.7.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	27
6.7.2.1. Historia.	27
6.7.2.2. Taxonomía.	28
6.7.2.3. Síntomas.	28
	28

6.7.3. <i>Salmonella spp.</i>	28
6.7.3.1. Historia.	28
6.7.3.2. Taxonomía.	28
6.7.3.3. Síntomas.	29
6.7.4. <i>Shigella spp.</i>	
6.7.4.1. Historia.	29
6.7.4.2. Taxonomía.	29
6.7.4.3. Síntomas.	29
6.7.5. <i>Staphylococcus aureus.</i>	29
6.7.5.1. Historia.	29
6.7.5.2. Taxonomía.	29
6.7.5.3. Síntomas.	30
6.8. Otros microorganismos.	30
6.8.1. Actinomicetos.	30
6.8.2. <i>Bacillus cereus.</i>	30
6.8.3. <i>Listeria spp.</i>	31
6.9. Sitios de interés.	31
6.9.1. Sector salud.	31
6.9.2. Sector alimentos.	32
6.9.3. Sector general.	32
6.10. Métodos de muestreo de los microorganismos en el aire.	34
6.10.1. Técnicas de sedimentación por gravedad.	34
6.10.2. Técnicas de filtración.	34
6.10.3. Técnicas de impacto sobre superficies sólidas.	35
6.10.4. Técnica de borboteo en líquidos.	35
6.11. Métodos de identificación.	35
6.11.1. Medios de cultivo.	35
6.11.1.1. Clasificación.	36
6.11.1.1.1. Según consistencia.	36
6.11.1.1.1.1. Líquidos.	36
6.11.1.1.1.2. Sólidos.	36
6.11.1.1.1.3. Semisólidos.	36
6.11.1.1.2. Según su origen.	36
6.11.1.1.2.1. Medios sintéticos.	37
6.11.1.1.2.2. Medios naturales.	37
6.11.1.1.3. Según su composición y utilización.	37
6.11.1.1.3.1. Medios simples.	37
6.11.1.1.3.2. Medios enriquecidos.	37
6.11.1.1.3.3. Medios selectivos.	37
6.11.1.1.3.4. Medios diferenciales.	38
6.11.1.1.3.5. Medios de enriquecimiento.	38
6.11.1.1.3.6. Medios de recuento.	38

6.11.1.1.3.7. Medios de transporte.	38
6.11.1.2. Medios de cultivo utilizados.	38
6.11.1.2.1. Agar Actinomices.	39
6.11.1.2.2. Agar Baird Parker.	39
6.11.1.2.3. Agar base Brilliance Bacillus cereus.	39
6.11.1.2.4. Agar base Brilliance Listeria.	40
6.11.1.2.5. Agar base Ogye.	40
6.11.1.2.6. Agar Eosina Azul de Metileno.	40
6.11.1.2.7. Plate Count Agar.	41
6.11.1.2.8. Agar Nutritivo.	41
6.11.1.2.9. Agar Pseudomonas Cetrimide.	41
6.11.1.2.10. Caldo Fluorocult Lauril Sulfato.	41
6.11.1.2.11. Medios selectivo Brilliance E.coli- coliformes.	42
6.11.1.2.12. Medio XLD.	42
6.11.2. Tinciones.	42
6.11.2.1. Tinciones simples.	43
6.11.2.2. Tinciones diferenciales.	43
6.11.2.2.1. Tinciones de Gram.	43
6.11.2.3. Tinción especial.	45
6.11.3. Pruebas bioquímicas.	45
6.11.3.1. Kits de identificación.	46
6.11.3.1.1. RapID ONE Enterobacterias System.	46
6.11.3.1.2. Staphylase test.	47
6.12. Instalaciones y equipos.	47
6.12.1. Laboratorio de aguas y alimentos.	47
6.12.2. Equipos.	48
6.12.2.1. Autoclave.	49
6.12.2.2. Balanza analítica.	49
6.12.2.3. Cabina de seguridad biológica.	50
6.12.2.4. Cámara de observación ultravioleta.	50
6.12.2.5. Cuenta colonias.	51
6.12.2.6. Horno.	51
6.12.2.7. Incubadoras.	52
6.12.2.7.1. Incubadora para mesófilos a 37°C.	52
6.12.2.7.2. Incubadora para hongos a 27°C.	52
6.12.2.8. Microscopio.	53
6.12.2.9. Neveras.	54
7. METODOLOGÍA.	55
7.1. Ensayos generales para el análisis de las variables.	55
7.1.1 Preparación de materiales.	55
7.1.2. Preparación de medios de cultivo.	55

7.1.3. Incubación de muestras.	56
7.1.4. Realización de ensayos.	56
7.2. Ensayos con diferentes tipos de agar.	58
7.2.1. Ensayo con diferentes tipos de agar en un laboratorio.	59
7.2.2. Ensayo con diferentes tipos de agar en un baño.	60
7.3. Ensayo con dos agares para posterior repique y tinción.	61
7.3.1. Procedimiento para realizar una tinción de Gram.	62
7.3.2. Pruebas con agar Plate Count.	63
7.3.3. Pruebas con agar Ogye.	63
7.4. Segundo ensayo con diferentes tipos de agar en un baño.	63
7.5. Análisis de Actinomicetos.	63
7.6. Elaboración del protocolo general.	64
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	65
8.1. Resultados de los ensayos generales para análisis de las variables.	65
8.1.1. Resultados primer ensayo general.	65
8.1.1.1. Resultados con agar Plate Count.	65
8.1.1.2. Resultados con agar Ogye.	67
8.1.2. Análisis de resultados del primer ensayo general.	69
8.1.2.1. Altura diferente vs tiempo constante.	70
8.1.2.2. Tiempo diferente vs altura constante.	72
8.1.3. Resultados segundo ensayo general.	74
8.1.3.1. Resultados con agar Plate Count.	74
8.1.3.2. Resultados con agar Ogye.	76
8.1.4. Análisis de resultados del segundo ensayo general.	77
8.1.4.1. Altura diferente vs tiempo constante.	77
8.1.4.2. Tiempo diferente vs altura constante.	78
8.1.5. Análisis final de los ensayos generales.	79
8.2. Resultados y análisis de los ensayos con diferentes tipos de agar.	80
8.2.1. Resultados y análisis del ensayo con diferentes tipos de agar en un laboratorio.	80
8.2.2. Resultados y análisis del ensayo con diferentes tipos de agar en un baño.	81
8.2.2.1. Pruebas realizadas a las colonias del agar EMB.	83
8.2.3. Análisis final de los ensayos con diferentes tipos de agar.	84
8.3. Resultados del ensayo con dos agares para posterior repique y tinción.	84
8.3.1. Resultados y análisis agar Plate Count.	84
8.3.2. Resultados y análisis agar Ogye.	87

8.5. Resultados y análisis de Actinomicetos.	90
8.6. Resumen final del protocolo general.	91
9. ENSAYO DEL PROTOCOLO GENERAL.	93
9.1. Sector salud	93
9.2. Sector alimentos	95
9.3. Sector general.	96
9.4. Identificación de microorganismos.	97
10. CONSIDERACIONES	100
11. CONCLUSIONES.	102
12. RECOMENDACIONES.	104
13. BIBLIOGRAFÍA.	105
PROTOCOLO	109
ANEXOS	136

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de los microorganismos de interés.	26
Tabla 2. Posición y altura de las cajas de Petri.	57
Tabla 3. Resultados primer ensayo general sector A - Plate Count	65
Tabla 4. Resultados primer ensayo general sector B – Plate Count.	66
Tabla 5. Resultados primer ensayo general sector C – Plate Count.	66
Tabla 6. Resultados primer ensayo general sector D – Plate Count.	67
Tabla 7. Resultados primer ensayo general sector A – Ogye.	67
Tabla 8. Resultados primer ensayo general sector B - Ogye.	68
Tabla 9. Resultados primer ensayo general sector C – Ogye.	68
Tabla 10. Resultados primer ensayo general sector D - Ogye.	69
Tabla 11. Influencia de la altura en el crecimiento bacteriano- Primer ensayo general.	71
Tabla 12. Influencia del tiempo de exposición en el crecimiento bacteriano-Primer ensayo general	73
Tabla 13. Resultados segundo ensayo general sector A – Plate Count.	74
Tabla 14. Resultados segundo ensayo general sector B – Plate Count.	75
Tabla 15. Resultados segundo ensayo general sector C – Plate Count.	75
Tabla 16. Resultados segundo ensayo general sector D – Plate Count.	76
Tabla 17. Influencia de la altura en el crecimiento bacteriano-Segundo ensayo general.	78
Tabla 18. Influencia del tiempo de exposición en el crecimiento bacteriano-Segundo ensayo general.	79
Tabla 19. Resultados del ensayo con diferentes tipos de agar en un laboratorio.	81
Tabla 20. Resultados del ensayo con diferentes tipos de agar en un baño.	82
Tabla 21. Morfología macroscópica de las colonias obtenidas en Plate Count.	85
Tabla 22. Morfología microscópica de las colonias obtenidas en Plate Count.	86
Tabla 23. Microorganismos identificados en el sector salud.	97
Tabla 24. Microorganismos identificados en el sector alimentos.	98
Tabla 25. Microorganismos identificados en el sector general.	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de los bacilos.	
Figura 2. Morfología de los cocos.	20
Figura 3. Morfología de los espirilos.	20
Figura 4. Diferencias estructurales de la pared celular entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.	44
Figura 5. Bacterias Gram positivas.	45
Figura 6. Bacterias Gram negativas.	45
Figura 7. Ubicación geográfica del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.	48
Figura 8. Autoclave	49
Figura 9. Balanza.	49
Figura 10. Cabina de seguridad biológica.	50
Figura 11. Cámara de observación ultravioleta.	50
Figura 12. Cuenta colonias.	51
Figura 13. Horno.	51
Figura 14. Incubadora de mesófilos.	52
Figura 15. Incubadora de hongos.	53
Figura 16. Microscopio.	53
Figura 17. Nevera	54
Figura 18. Sectores y subsectores del laboratorio.	56
Figura 19. Ubicación de las cajas de Petri en el laboratorio.	58
Figura 20. Distribución de los diferentes agares en el laboratorio.	59
Figura 21. Sectores 1 y 2 del laboratorio con análisis específicos.	60
Figura 22. Agar EMB en un tanque sanitario.	61
Figura 23. Procedimiento para realizar una tinción de Gram.	62
Figura 24. Análisis de Actinomicetos en una zona de trabajo de un laboratorio de suelos.	64
Figura 25. Crecimiento en el agar Ogye de un ensayo general.	70
Figura 26. Diferencia del crecimiento bacteriano a diferentes alturas y tiempo constante – Primer ensayo general.	72
Figura 27. Diferencia del crecimiento bacteriano a diferente tiempo y altura constante – Primer ensayo general.	74
Figura 28. Crecimiento en el agar Ogye – Segundo ensayo general.	77
Figura 29. Crecimiento bacteriano con diferentes tipos de agar en un baño.	82
Figura 30. Repique en agar EMB.	83
Figura 31. Repiques en agar Nutritivo.	84
Figura 32. Tinción de hongos.	87

Figura 33. Crecimiento bacteriano en los diferentes tipos de agar – Segunda prueba en un baño.	88
Figura 34. Control positivo y negativo para E.coli en caldo Fluorocult.	89
Figura 35. Prueba con el test específico para Salmonella.	90
Figura 36. Crecimiento de Actinomicetos en dos diferentes agares.	91
Figura 37. Sala de recuperación.	93
Figura 38. Quirófano.	94
Figura 39. Sala de espera.	94
Figura 40. Sala de procesamiento de carnes.	95
Figura 41. Comedores.	96
Figura 42. Biblioteca.	96

1. RESUMEN

En el presente trabajo se determinaron las condiciones óptimas de tiempo de exposición, altura y número de cajas de Petri necesarias para realizar un análisis microbiológico de ambientes por el método de sedimentación por gravedad, realizando ensayos en diferentes instalaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira. Para lo cual se obtuvo que el tiempo de exposición de los medios de cultivo al ambiente sea de 30 minutos; ubicando las cajas de Petri a una altura media, generalmente mesones de trabajo; y estableciendo 5 cajas por agar, distribuidas estratégicamente en toda el área a muestrear.

Se utilizaron diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales, con el fin de observar si se presentaba algún tipo de crecimiento siguiendo el método de sedimentación por gravedad, ya que estos agares no son usados comúnmente para un muestreo de ambientes. Y así se determinaron los microorganismos y medios de cultivo a tener en cuenta en el protocolo, los cuales son: *Escherichia coli*, *Shigella spp*, *Salmonella spp*, que crecen en el medio EMB; *Pseudomonas aeruginosa*, que presenta crecimiento en el medio Cetrimide; y *Staphylococcus aureus*, que se desarrolla en el medio Baird Parker. Adicionalmente, se utilizaron dos medios de cultivo indicadores de contaminación microbiana como lo son el agar Plate Count para aerobios mesófilos y Ogye para hongos y levaduras.

Finalmente con las condiciones establecidas anteriormente, se elaboró el PROTOCOLO DEMUESTREO MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES POR EL MÉTODO DE SEDIMENTACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Shigella spp* MEDIANTE LOS KITS MICROBIOLÓGICOS *RapID ONE* y *Staphylase test de Remel*, y se realizaron muestreos en lugares que normalmente solicitan un análisis de ambientes al Laboratorio de Análisis de Aguas y alimentos de la UTP, con el objetivo de identificar los microorganismos mencionados. Dentro de los sitios muestreados están un quirófano, una sala de recuperación, una sala de espera, una cocina industrial, un restaurante y una biblioteca, evidenciando la presencia de microorganismos como: *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Moellerella wisconsensis*, *Shigella spp* y *Staphylococcus aureus*. A pesar de que no se encontraron todos los microorganismos establecidos en el protocolo, no se puede afirmar que estos no están presentes en el ambiente.

2. JUSTIFICACIÓN

La microbiología del aire tiene sus inicios en el siglo XIX, con Pasteur y Miquel quienes diseñaron métodos para estudiar los microorganismos en el aire y descubrir la causa de algunas enfermedades, [1], pero no es hasta mediados del siglo XX, cuando se entiende la importancia de conocer cómo se propagaban las infecciones respiratorias, [2].

Aunque el aire no sea un hábitat para los microorganismos, es decir que no crecen en él, se pueden encontrar infinidad de viajeros como bacterias, algas, protozoos y virus en forma de bioaerosoles o en partículas de polvo, [3]. Factores como la lluvia, el movimiento de aguas en ríos y mares, tratamientos de aguas residuales, aspersores de riego, aire acondicionado, partículas de polvo proveniente del suelo o secreciones respiratorias del hombre y los animales son los encargados de producir aerosoles que lleven microorganismos vivos, [1].

Esta biota tiene una considerable importancia biológica y económica. Numerosas enfermedades de plantas son causadas por hongos, virus y bacterias, produciendo graves pérdidas en las cosechas. Los microorganismos presentes en el aire también pueden contaminar los alimentos y materiales orgánicos (cuero, textiles, papel) produciendo su alteración,[1].

En países como España, México, Chile y Estados Unidos se han realizado algunos estudios aislados con respecto a la calidad microbiológica del aire, [4,5,6], con el objetivo de determinar los niveles de contaminación de áreas específicas, los que fueron comparados con los niveles establecidos internacionalmente, para implementar normas vigentes de control microbiológico y establecer niveles de alerta y acción, [4].

En Colombia la legislación y normatividad vigente se refiere principalmente a los contaminantes químicos de fuentes móviles y fijas, como las resoluciones: 2153 de Noviembre del 2010, Resolución 909 del 2008, Resolución 627 del 2006, entre otras, [8]. Pero la información en cuanto a la microbiología del aire es demasiado limitada.

Debido a la poca información que se tiene en el país con respecto al tema de estudio, y a la inexistencia de parámetros que guíen los muestreos microbiológicos de ambientes, se vió la necesidad de que el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la UTP tenga las bases necesarias para realizar dicho muestreo y la posterior identificación de algunos microorganismos presentes.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la UTP realiza pruebas y ensayos físicos, químicos y microbiológicos de materias primas, productos terminados, empaque, equipos, manipuladores y ambientes para el sector alimenticio enfocado al servicio de las empresas de la región; así como el análisis fisicoquímico y microbiológico de aguas (Residual doméstica e industrial, potable, subterránea, cruda, entre otras), [7].

Con respecto al análisis de ambientes, el laboratorio no posee un protocolo, que contenga información para seguir los pasos necesarios a la hora de realizar un muestreo microbiológico, en el cual se involucren las múltiples variables que afectan este tipo de análisis. Áreas como quirófanos, industrias de alimentos y zonas de gran afluencia de público, como salas de espera y bibliotecas; son las más interesadas en evaluar la calidad microbiológica del aire que es de vital importancia para el bienestar de la población, dado el potencial de riesgo por la presencia de microorganismos en el ambiente.

Se plantea entonces:

¿El laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, está en capacidad de implementar una técnica que involucre los factores como tiempo de exposición, altura y número de cajas de Petri, que intervienen en un análisis microbiológico del ambiente en los lugares antes mencionados?

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Elaborar un protocolo de muestreo que permita evaluar la calidad microbiológica del aire para el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Establecer las variables que intervienen en la medición de la calidad microbiológica del aire por el método de sedimentación.

4.2.2. Evaluar las variables como son: El número de cajas de Petri, la altura a la que se ubican las cajas y el tiempo de exposición en el medio; mediante ensayos por duplicado usando el método de sedimentación.

4.2.3. Definir los métodos para la identificación de microorganismos de interés, mediante agares específicos que se incluirán en el protocolo, a través de la revisión de sus características, composición y especificidad.

4.2.4. Adaptar las condiciones de muestreo generales a los sitios de interés donde se probará el protocolo.

4.2.5. Emitir un juicio sobre la calidad microbiológica del aire, de acuerdo a los resultados obtenidos y los microorganismos a identificados.

4.2.6. Elaborar un protocolo para realizar el muestreo del análisis microbiológico de ambientes según el método de sedimentación que involucre las variables estudiadas.

5. ANTECEDENTES

5.1. Desarrollo histórico de la microbiología del aire.

Lucretius en el año 55 a.C. observó las partículas de polvo brillando en un rayo de sol en una habitación oscura y concluyó que debían ser corpúsculos flotando en el aire; aunque fue necesario esperar hasta el descubrimiento del microscopio para ver que en el aire había microorganismos vivos. Las esporas de los hongos fueron vistas por Valerius Cordus en el siglo XVI, pero fue Micheli quién primero las dibujó observando las esporas de los mohos que se transmitían por el aire. Leeuwenhoek observa y describe por primera vez las bacterias en distintos ambientes y supone que *“Estos animáculos pueden ser transportados por el viento mediante el polvo que flota en el aire”*.

En 1855 Gaultier de Claubry inauguró una investigación científica en la que estudió los microorganismos reteniéndolos al hacer borbotear el aire en agua destilada. Pero fue Pasteur el que perfeccionó estos procedimientos realizando los primeros estudios precisos de las bacterias en el aire, demostrando así la no existencia de la generación espontánea.

En aquella época uno de los motivos que incentivaron el estudio de los microorganismos del aire fue descubrir la causa de algunas enfermedades; como la epidemia del cólera que apareció en Europa en 1847. Varias investigaciones se realizaron para descubrir en el aire de los hospitales los gérmenes causantes de esta enfermedad.

Pierre Miquel fue sin duda el investigador que más estudió los microorganismos en el aire, realizando numerosos ensayos y creando una gran variedad de métodos de análisis, además de determinar la influencia de los diversos factores (temperatura, lluvia, corrientes de aire, altitud, número de personas etc.). En 1882 demostró que a medida que aumenta la altitud, disminuye el número de microorganismos. Para la época lo más difícil fue determinar el tipo de bacterias presentes en el aire, fueron Miquel y Cambert en 1901 quienes afirman que la mayoría de bacterias son saprófitas y proceden del suelo, encontrando una gran variedad, siendo las más frecuentes las bacterias cromógenas, los bacilos esporulados y los cocos.

La hipótesis de la existencia de bacterias en el aire llevó a Lister en 1867 a la utilización de pulverizaciones del aire con ácido carbólico para evitar la infección de las heridas quirúrgicas, comenzando así la época de la antisepsia en la cirugía. Posteriormente se demostró la presencia de varias bacterias patógenas, como *Staphylococcus aureus*,

Streptococcus pyogenes, *Mycobacterium tuberculosis*, etc. Y que, por lo tanto, a través de el podían transmitirse enfermedades infecciosas.

Ya en los años treinta, aparecen los trabajos de Wells, que realizó en numerosos ambientes de New York como las calles, hospitales y escuelas y descubrió la existencia de los “núcleos goticulares”, demostrando que algunos microorganismos patógenos podían transmitirse a grandes distancias y sobrevivir en el ambiente durante semanas o meses.

La década de los años cincuenta se caracterizó por la aparición de una ciencia multidisciplinar, la Aerobiología, en la que se estudian los microorganismos del aire desde todos sus aspectos. Varios autores estudian la supervivencia de los microorganismos en los aerosoles tales como: *Bacillus*, *Echerichia coli*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Micobacterium*, *Staphylococcus* etc; algunos hongos como: *Aspergillus* y *Pestalotia*.

Un avance importante para el control de los microorganismos en ambientes cerrados, fue la utilización de los filtros para el aire de fibra de vidrio o de alta eficacia (HEPA), ampliamente utilizados en hospitales e industria farmacéutica para conseguir salas o zonas asépticas.

En la década de los setenta surge una mayor preocupación por el control del aire en los ambientes cerrados principalmente en los hospitales, industrias farmacéuticas y alimentarias. Así por ejemplo en 1969 la OMS dicta las primeras normas recomendadas para la fabricación y la inspección de la calidad de los medicamentos en los que se incluye el control microbiano del aire de los locales. Desde entonces el estudio microbiológico de estos ambientes ha ido en aumento, siendo actualmente práctica habitual e incluso obligatoria, el efectuar recuentos y controles periódicos del aire en las zonas estériles y limpias de hospitales, industrias de alimentos y farmacéuticas. También suelen controlarse otros ambientes cerrados como fábricas de aparatos electrónicos, escuelas y edificios de oficinas. Este último caso, se debe a que, en los últimos años, se ha descrito una nueva enfermedad “El síndrome del edificio enfermo” que se produce en los ocupantes de determinados edificios. El origen de los síntomas, irritación de las membranas mucosas, dolor de cabeza, erupciones y dificultad respiratoria, no está aún muy claro, pero entre las posibles causas se citan factores ambientales, químicos y microorganismos.

Actualmente nos encontramos en un periodo de gran interés en la microbiología del aire, lo que ha supuesto un desarrollo de la actividad investigadora en este campo, [12].

6. MARCO TEÓRICO

6.1. Las bacterias.

Se conocen colectivamente con el nombre de microorganismos distintos grupos de organismos, la mayor parte de cuyos miembros son de dimensiones microscópicas. Se incluyen entre ellos organismos que difieren ampliamente entre sí en su forma, ciclo biológico y sus modos de vida, [15].

En este caso se hablará de las bacterias, que son organismos unicelulares muy pequeños y relativamente sencillos, cuyo material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial. Por este motivo las bacterias se denominan procariotas. Las bacterias constituyen el reino llamado mónera. Las células bacterianas suelen presentar una morfología determinada entre varias posibles: bacilo (en forma de bastoncillo), coco (célula esférica u ovoide) y espirilo (en forma espiral o helicoidal), [18]. Éstas son las morfologías más corrientes (figuras 1-3).

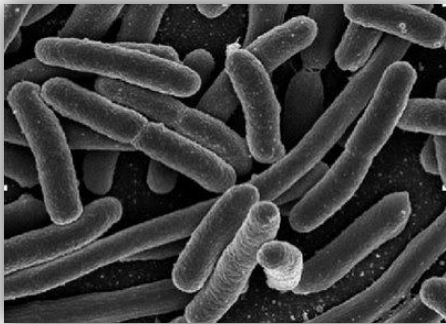


Figura 1. Morfología de los bacilos.

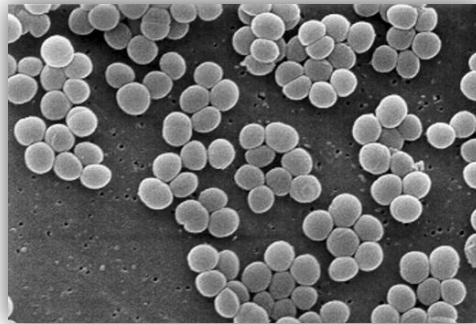


Figura 2. Morfología de los cocos.

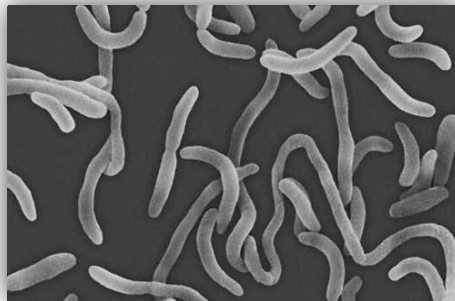


Figura 3. Morfología de los espirilos.

Las bacterias pueden agruparse en parejas, cadenas, racimos u otras formaciones. Las bacterias están recubiertas por paredes celulares compuestas por una sustancia denominada peptidoglicano. Las bacterias se reproducen generalmente dividiéndose en dos células hijas iguales, proceso denominado fisión binaria. Para su nutrición la mayoría de las bacterias utiliza materia orgánica que puede obtenerse en la naturaleza a partir de microorganismos muertos o de un huésped vivo. Ciertas bacterias pueden formar sus propios nutrientes por fotosíntesis y algunas pueden nutrirse a partir de compuestos inorgánicos, [18].

6.2. Bacterias patógenas.

Los microorganismos que causan infecciones y enfermedades se denominan patógenos y las características que les permiten causar enfermedad se denominan factores de virulencia, la mayoría de estos factores protegen al microorganismo contra el ataque del huésped o median sus efectos perjudiciales sobre las células del huésped. El término patogenicidad refleja el grado de capacidad de causar enfermedad de un microorganismo; uno de patogenicidad elevada muy probablemente cause enfermedad cuando se encuentre con el huésped mientras que la probabilidad de que un microorganismo de patogenicidad baja provoque una infección es mucho menor. Cuando se produce la enfermedad los microorganismos muy virulentos a menudo causan graves daños en el huésped humano. El nivel de gravedad disminuye con la disminución de la virulencia del microorganismo.

Los microorganismos que solo causan infecciones en presencia de la interrupción o el mal funcionamiento de uno o más mecanismos de defensa del huésped se conocen como patógenos oportunistas y las infecciones que causan se denominan como infecciones oportunistas. Por otro lado algunos patógenos que se sabe, causan infecciones graves, pueden ser parte de la flora normal de una persona y nunca causar enfermedades en esa persona. En cambio el mismo microorganismo puede causar infecciones potencialmente mortales cuando se trasmite a otra persona. Las razones de estas variaciones no se comprenden totalmente, pero estos resultados tan diferentes sin duda implican interacciones complejas entre el microorganismo y el ser humano, [13].

6.3. El aire y las bacterias.

A lo largo de nuestra vida, los humanos respiramos cerca de 500 millones de litros de aire, muchos de los cuales contienen polvo y gotas de humedad, en los que se encuentran presentes microorganismos; estos no crecen en el polvo pero pueden ser transitorios y variables, dependiendo del ambiente. Su nivel se controla naturalmente mediante el grado de humedad, tamaño y nivel de las partículas de polvo, la temperatura y la velocidad del aire, así como la resistencia de los microorganismos a las sequías. Por lo general, el aire seco con bajo contenido de polvo y una temperatura más alta tiene un nivel microbiano bajo. Si el entorno contiene una fuente de patógenos por ejemplo granjas de animales y aves de corral, planta de tratamiento de aguas residuales, sector de manipulación de alimentos crudos, hospitales, entre otros; se pueden transferir diferentes tipos de bacterias incluidos patógenos y virus por medio del aire, [9].

Los microorganismos del aire proceden del suelo, del agua, de las plantas, de los animales y de otras fuentes. En el aire de ambientes exteriores predominan los microorganismos del suelo. En los interiores, la concentración de microorganismos es considerablemente más alta especialmente de los que derivan del tracto respiratorio humano.

Muchos microorganismos sobreviven con dificultad en el aire, y por ellos algunos patógenos solo se transmiten en los humanos en distancias cortas. No obstante otros patógenos resisten condiciones de sequedad y pueden permanecer vivos en el polvo durante largos periodos de tiempo.

Durante el estornudo se genera un gran número de pequeñas gotas de líquido y se produce un número considerable de ellas mientras tosemos o cuando simplemente hablamos. Cada pequeña gota infecciosa tiene un diámetro de unos 10 μm y puede quedar suspendida en el aire conteniendo una o dos células bacterianas. Debido a su pequeño tamaño estas gotas se evaporan rápidamente en el aire, dejando un núcleo de materia orgánica y de mucus al que se adhieren las bacterias, [10].

6.4. Los hongos.

La micología es la rama de la microbiología que se encarga de los hongos y sus enfermedades, las cuales comenzaron a estudiarse desde la más remota antigüedad, [19].

Los hongos son eucariotas, organismos cuyas células poseen un núcleo definido que contiene el material genético celular, rodeado por una membrana nuclear. Constituyen el

reino Fungi, pueden ser unicelulares (microscópicos) o pluricelulares (macroscópicos). Pueden crecer en dos formas básicas: levaduras y mohos. Los hongos pueden reproducirse de forma sexual o asexual y se nutren absorbiendo materia orgánica en solución de su medio ambiente: suelo, agua o un huésped animal o vegetal, [18]. La mayor parte de los hongos se encuentran en la naturaleza y crecen con facilidad sobre fuentes simples de nitrógeno y carbono.

Las infecciones causadas por hongos son las micosis. Las de mayor incidencia, la candidiasis y las dermatofitosis son causadas por hongos que forman parte de la flora microbiana normal o están muy adaptadas para sobrevivir en el huésped humano. Las micosis pueden clasificarse por conveniencia como superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas, [16].

En general, las micosis superficiales se generan por contacto directo con el hongo o con una persona o animal infectado, y afectan la piel, ojos, senos, bucofaringe, oído externo, vagina entre otros.

Por lo general las micosis subcutáneas se adquieren del ambiente, y el hongo penetra por un traumatismo en la piel.

En las micosis sistémicas las esporas del hongo penetran por inhalación, después ocurre la colonización y en la mayoría de personas hay una infección pulmonar asintomática.

Las micosis oportunistas son causadas por hongos saprobios que se transforman en patógenos, [19].

6.5. El aire y los hongos.

De todos los microorganismos presentes en la atmosfera, las esporas de los hongos (células encargadas de la reproducción) representan el grupo más numeroso. La inhalación de esporas fúngicas puede desencadenar una variedad de síntomas respiratorios, como rinitis alérgica, asma, bronquitis crónica, entre otras. Dichas

enfermedades dependen de la especie, las condiciones del medio en el que se desarrolla el hongo, el clima, y la actividad inmunológica del sujeto.

Las estimaciones del número mundial de especies de hongos son muy variables, pero existen por lo menos un millón y probablemente alcancen los cinco millones. Su presencia en la atmosfera ha sido demostrada por su crecimiento en medios de cultivo,

denominándose cultivables, sin embargo, se considera que es una pequeña parte de la población que es aerotransportada, dado que la mayoría podría estar muerta o encontrarse en forma viable no cultivable. Factores como la temperatura, la humedad relativa del aire y la exposición a la luz solar y la lluvia pueden disminuir rápidamente el proceso de dispersión de las esporas, [11].

Algunas enfermedades fúngicas transmitidas por el aire, son responsables de enfermedades pulmonares, desde donde pueden invadir otros tejidos y producir una enfermedad sistémica. Por otra parte las esporas de varios mohos causan reacciones de hipersensibilidad que afectan el aparato respiratorio superior. Estudios epidemiológicos han demostrado que la inhalación de las esporas de algunos hongos son la causa de problemas respiratorios asociados al “síndrome del edificio enfermo” y otras enfermedades ocupacionales, [12].

6.6. Factores que contribuyen a la permanencia de los microorganismos en el aire.

El desarrollo de microorganismos en el aire, está influenciado por su puesto por factores físicos tales como humedad relativa, temperatura, oxígeno, materia orgánica, ventilación, polvo, entre otros, pero lo primero que determina que una bacteria o un hongo se mantenga en el ambiente viable, es la cantidad de agua disponible que existe, [29].

6.6.1. Humedad relativa.

Es el factor más importante. Cuando la humedad relativa del aire decrece, disminuye el agua disponible para los microorganismos, lo que causa deshidratación y por lo tanto la inactivación de muchos de ellos. La desecación puede causar una pérdida de viabilidad en las capas más bajas de la atmósfera. El límite menor para el crecimiento de hongos es del 65% de humedad relativa; mientras que las bacterias requieren un porcentaje mayor, [12].

6.6.2. Temperatura.

Está muy relacionada con la humedad relativa, por lo que es difícil separar los efectos que producen ambas. A bajas temperaturas inclusive las de congelación, no se destruyen los microorganismos, solo se impide su multiplicación. Diversos estudios muestran, que el incremento de la temperatura disminuye la viabilidad de los microorganismos, [12].

Cada microorganismo posee una temperatura óptima de crecimiento y desarrollo, por lo cual la cantidad de los microorganismos, puede variar dependiendo de su clasificación y características intrínsecas, [29].

6.6.3. Oxígeno.

Se ha observado una correlación negativa entre la concentración de oxígeno y la viabilidad, que aumenta con la deshidratación y el tiempo de exposición. La causa de esta inactivación podría ser los radicales libres de oxígeno, [12].

6.6.4. Materia orgánica.

La atmósfera contiene muy poca concentración de materia orgánica, y en la mayoría de los casos, es insuficiente para permitir el crecimiento heterotrófico. El agua disponible es escasa por lo que, incluso el crecimiento de microorganismos autótrofos está limitado, [12].

6.6.5. Ventilación.

La aeración es un factor que incide en el estado de conservación de los objetos presentes en los ambientes interiores. Cuando un local está bien ventilado, se evapora la humedad y se reduce la temperatura superficial, modificándose estos dos factores ambientales de los que depende el crecimiento microbiano. El aire estancado favorece considerablemente la propagación de los microorganismos, así como su deposición en superficies, alimentos, agua y tierra, mientras que el aire circulante no solo contribuye a impedir que los microorganismos suspendidos en él se depositen, sino que ayude a mantener seco el local, de ahí que la ventilación es esencial para lograr una baja actividad biológica en los ambientes internos, [29].

6.6.6. Polvo.

Entre los elementos que componen la atmósfera tenemos el polvo, que es un factor tóxico en la misma, ya que esta siempre cargado de esporas de microorganismos y estas constituyen el componente mayoritario. Como los componentes del polvo, tanto químicos como biológicos, pueden dañar los materiales, éste debe ser retirado periódicamente para prevenir el biodeterioro. El polvo que contiene componentes biológicos, se deposita sobre los materiales por diferentes vías, siendo una vía de infección cuando las condiciones atmosféricas sean tales que favorezcan el desarrollo de microorganismos. Además, contiene huevos de insectos y esporas de microorganismos, que pueden ingresar al torrente respiratorio, [29].

6.7. Microorganismos de interés para el protocolo.

En la tabla 1, se reúnen los microorganismos de interés para el protocolo, sus principales características morfológicas, características generales y enfermedades que producen.

Estos fueron elegidos debido a que son los más comunes a la hora de realizar un análisis microbiológico y de ser generadores de graves enfermedades. Además, en el transcurso de la elaboración de este documento, se explicará detalladamente los motivos que llevaron a decidir cuáles serán los microorganismos de interés para el protocolo.

MICROORGANISMO	MORFOLOGÍA	CARACTERÍSTICAS GENERALES	ENFERMEDAD QUE PRODUCE
<i>E. coli</i>	Bacilos rectos Gram negativos no esporulados	Anaerobio facultativo, mesófilo	Infecciones del aparato urinario y enfermedades diarreicas.
<i>P. aeruginosa</i>	Bacilos rectos o curvos Gram negativos no esporulados	Aerobio estricto, mesófilo.	Infecciones nosocomiales
<i>Salmonella spp.</i>	Bacilos medianos Gram negativos	Aerobio facultativo, mesófilo	Salmonelosis
<i>Shigella spp.</i>	Bacilos medianos Gram negativos	Anaerobio facultativo, mesófilo	Shigelosis
<i>S. aureus</i>	Cocos Gram positivos	Anaerobio facultativo, mesófilo	Abscesos, neumonía, endocarditis, gastroenteritis estafilocócica, infecciones cutáneas.

Tabla 1. Características generales de los microorganismos de interés,[14].

6.7.1. *Escherichia coli*.

6.7.1.1. Historia.

Este microorganismo, originalmente fue denominado *Bacterium coli*, fue aislado por Escherich en las heces de los niños hace más de dos siglos. En 1920, al microorganismo le fue asignada la denominación nueva de *Escherichia*. A mediados de la década de los 40, el papel de *Escherichia coli* como enteropatógeno fue demostrada de modo válido y de aquí que posteriormente fuesen adoptadas medidas de control para reducir la incidencia de las gastroenteritis.

E. coli patógeno intestinal, se define como aquellas cepas de *E. coli* que son capaces de causar una enfermedad diarreica en el hombre y en los animales. En la actualidad, han sido relacionados con la enfermedad transmitida por alimentos cuatro tipos principales de *E. coli* patógeno: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasor (EIEC) y *E. coli* enterohemorrágico (*E. coli* O157:H7; EHEC), [14].

6.7.1.2. Taxonomía.

Las bacterias de la especie *E. coli* son representantes de la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos cortos gram negativos, catalasa positiva, oxidasa negativos, anaerobios facultativos y fermentan la lactosa, [17].

6.7.1.3. Síntomas.

Los signos y síntomas de la enfermedad depende del tipo de *E. coli* patógeno intestinal que causa la infección, algunos de estos son: diarrea con moco, náuseas, dolor abdominal, vómito, cefalea, fiebre, escalofríos, retortijones abdominales, malestar general, diarrea con betas sangre, diarrea muy sanguinolenta y en los casos más graves puede producir convulsiones, estado de coma y muerte, [17].

6.7.2. *Pseudomonas aeruginosa*.

6.7.2.1. Historia.

Algunas *Pseudomonas* como la *Pseudomonas aeruginosa* es la especie de mayor interés veterinario, fue descubierta por A. Lücke en 1962, después de observar en los apósitos quirúrgicos, un exudado color azul verdoso a consecuencia de un proceso infeccioso provocado por estos microorganismos, el cual fue aislado por *Gestad* en 1882, [16].

6.7.2.2. Taxonomía.

Es un aerobio estricto, bacilo, gram negativo y se le encuentra como bacteria única, en pares y ocasionalmente en cadenas cortas. Es oxidasa positiva, no fermenta carbohidratos, pero muchas cepas oxidan la glucosa, [16].

6.7.2.3. Síntomas.

Produce infección en heridas y quemaduras, formando pus color azul verdoso; cuando se introduce por punción lumbar causa meningitis, e infección del aparato urinario cuando la vía de entrada son catéteres o instrumentos, [16].

6.7.3. *Salmonella* spp.

6.7.3.1. Historia

En 1880 Eberth descubrió el agente etiológico de la fiebre tifoidea: *Salmonella typhi*; y en 1884 Gaffky. *Salmonella cholerae-suis* fue aislada en cerdos en los que se diagnosticó clínicamente que padecían fiebre porcina. El nombre del género fue sugerido por Lignières en 1900 en honor de la investigación del Dr. Salmon. El primer brote de Salmonelosis transmitida por alimentos confirmada en el laboratorio implicó 57 personas que comieron carne de vaca enferma. Se aisló *S. enteritidis* en los órganos de una víctima que no había sobrevivido, en la carne y en la sangre del animal. Desde entonces, las *Salmonellas* han sido identificadas como la causa más importante de fiebre entérica y de la gastroenteritis, [14].

6.7.3.2. Taxonomía.

Salmonella es un género de la familia Enterobacteriaceae. Se caracterizan como bacterias gram negativas, anaerobias facultativas, de forma bacilar, producen ácido, y a veces gas de la glucosa, suelen ser catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen los nitratos a nitritos. La mayoría de los representantes de la familia se encuentran en el tracto intestinal del hombre y de los animales, bien como patógenos bien como comensales, [14].

6.7.3.3. Síntomas.

Algunos de los síntomas son gastroenteritis, fiebre entérica, septicemia e infecciones focales, [14].

6.7.4. *Shigella* spp.

6.7.4.1. Historia.

Las shigelas fueron descritas por primera vez en 1898 por Shiga, [14]. En Estados Unidos, antes del decenio de 1950, la especie predominante era la *S. dysenteriae* en la actualidad la que predomina es la *S. sonnei*. Entre 1983 y 1987 hubo 44 brotes en la unión Americana que afectaron a 9971 personas, de las cuales dos murieron. En un brote ocurrido en 1987, varias miles de personas resultaron afectadas por comer platillos comerciales preparados bajo condiciones higiénicas inadecuadas. En general, se ha implicado mas brotes a los establecimientos de servicios de comida, y la causa principal ha sido la deficiente higiene personal, [9].

6.7.4.2. Taxonomía.

El género *Shigella* está constituido por bacterias inmóviles que se ajustan a las definiciones de la familia enterobacteriaceae. Están emparentadas íntimamente con *E.coli* en cuanto a la homología de su DNA. Las células son gram negativas con forma de bastones, anaerobios facultativos. Por lo general son catalasa positivas, oxidasa negativas y lactosa negativas. Fermentan azúcares, casi siempre sin formar gas, [9].

6.7.4.3. Síntomas.

La disentería por *Shigella* se caracteriza por la aparición de espasmos abdominales, diarrea, fiebre, heces con moco y a veces sangre, [14].

6.7.5. Staphylococcus aureus.

6.7.5.1. Historia.

La denominación *Staphylococcus* (que significa racimos parecidos a los de la uva) fue mencionada por primera vez por Sir Alexander Ogston quién, en 1979 descubrió la presencia de este organismo en el pus obtenido de abscesos humanos y demostró que causaba una enfermedad piógena (infección causada por bacterias) cuando se inyectaba en los ratones. Dos años después, Rosenbach descubrió su crecimiento en un cultivo puro y llamó *Staphylococcus aureus* al coco que formaba colonias de color naranja, [14].

6.7.5.2. Taxonomía.

S. aureus es la especie tipo del género *Staphylococcus*, que se presenta en forma de cocos gram positivos, catalasa positivo y anaerobio facultativo, [14].

6.7.5.3. Síntomas.

Los síntomas correspondientes a una intoxicación alimentaria generada por las enterotoxinas estafilocócicas son: náuseas, vómitos, arcadas, espasmos abdominales y diarrea. En los casos graves, se pueden presentar cefalea y colapso, [14].

6. 8. Otros microorganismos.

A continuación se citan otros de los microorganismos trabajados durante la práctica, pero que no se incluyeron en el protocolo final.

6.8.1. Actinomicetos.

Tradicionalmente se han estudiado en micología, pero en realidad constituyen un grupo heterogéneo de bacterias que en algún momento de su ciclo de crecimiento desarrollan filamentos ramificados que se fragmentan en elementos cocoides, bacilares o ambos.

Tienen características de bacterias como su pequeño tamaño, núcleos procarióticos, prácticamente todos son gram positivos y son sensibles a antibióticos antibacterianos mas no a anti fúngicos.

Los actinomicetos se parecen a los hongos por su crecimiento atípico, presencia de filamentos y ramificaciones en tejidos o cultivos, y producción de enfermedades crónicas. Pueden tener metabolismo oxidativo (aerobios) y encontrarse en la naturaleza, o fermentativo (anaerobio) y hallarse como parte de la flora endógena en cavidades de seres humanos y otros vertebrados, [19].

6.8.2. *Bacillus cereus*.

Es un bacilo formador de esporas responsable de intoxicaciones alimentarias, siendo su hábitat natural el suelo, contamina con frecuencia cereales, leche, budines, cremas pasteurizadas y especias, entre otros alimentos.

La intoxicación alimentaria por *B.cereus*, se presenta después de la ingestión de alimentos en los que ha crecido el organismo y formado sus toxinas.

La familia *Bacillaceae* contiene una diversidad de bacterias formadoras de esporas incluyendo desde aerobios estrictos hasta anaerobios obligados, cocos y bacilos, tanto psicrófilos como termófilos

La producción de esporas en presencia de oxígeno es un rasgo que define el género, así como su morfología. Son saprofitos ampliamente distribuidos en el ambiente natural en suelos de todo tipo, y puede ser encontrado en el polvo y en el aire, por lo tanto tiene considerable oportunidad para estar presente en o sobre los alimentos. Las esporas fácilmente sobreviven la distribución en polvos y aerosoles siendo vehiculizadas desde estos lugares a otros hábitats, [14].

6.8.3. *Listeria*.

Existen ocho especies de *Listeria* de las cuales solo dos especies se asocian a enfermedades humanas, la *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. La especie de mayor importancia clínica y que se aísla con frecuencia en los laboratorios clínicos es la *L. monocytogenes*, además de haber sido aislada en una gran variedad de fuentes como agua dulce, agua salada, polvo ambiental, fertilizantes alimentos crudos, productos lácteos y a partir de heces de seres humanos. Son bacilos cortos Gram positivos y anaerobios facultativos.

L. monocytogenes es un patógeno oportunista, capaz de sobrevivir y multiplicarse fuera de hospedadores animales y en medios nutritivos muy simples; esta bacteria afecta a mujeres gestantes y bebés recién nacidos. La infección generalmente se produce a través del intestino y el periodo de incubación varía desde aproximadamente dos días hasta seis semanas, [14].

6.9. Sitios de interés.

En Colombia la legislación y normatividad vigente, se refiere principalmente a los contaminantes químicos de fuentes móviles y fijas; y no a la contaminación microbiológica en ambientes. Es por esto, que se ve la necesidad de realizar este tipo de muestreos, en lugares donde es de vital importancia su análisis, por el riesgo que representa para las personas.

A continuación se hablará de la importancia del análisis microbiológico del aire en los sitios definidos a analizar.

6.9.1. Sector salud.

Una infección hospitalaria, también llamada infección nosocomial, es una condición local o sistémica resultante de un agente infeccioso o sus productos, que ocurre durante la

estancia en un centro sanitario y que no estaba presente en la admisión. Algunas infecciones nosocomiales se adquieren de enfermos con enfermedades transmisibles, pero otras están causadas por patógenos, seleccionados y mantenidos dentro del ambiente hospitalario. Estas enfermedades se propagan fácil y rápidamente por varias razones: Muchos enfermos tienen bajas resistencias a las enfermedades infecciosas por causa de su enfermedad; el personal sanitario se mueve de un enfermo a otro, incrementando la posibilidad de transferir patógenos; en las salas de maternidad de los hospitales, los niños recién nacidos son especialmente susceptibles a ciertas infecciones, porque carecen de mecanismos defensivos bien desarrollados, [10].

Algunos factores de la contaminación hospitalaria son: contacto directo por medio de alimentos o implementos contaminados, contacto indirecto con las manos de los trabajadores de la salud, por inhalación de partículas que circulan en el aire y en el caso de los quirófanos, salas de parto o unidades de cuidados intensivos, por contaminación de materiales y equipos con partículas remanentes del medio ambiente, [20].

Una de las áreas más sensibles son las salas de cirugía, el aire de éstas puede contener micropartículas suspendidas en el aire conformadas por microgotas de saliva, células descamadas de la piel, polvo, etc. El nivel microbiológico del aire de la sala de cirugía está directamente relacionado con la cantidad de gente circulante en la sala, y con las corrientes de aire provenientes de corredores y áreas adyacentes, [21].

Las consecuencias de una herida infectada pueden ir desde molestias mínimas pasajeras hasta la muerte, y en algunos casos, los resultados de esa infección anulan los beneficios de la cirugía realizada. La adquisición de otras infecciones nosocomiales representa un grave problema para muchos pacientes en el periodo posoperatorio; lo que convierte a este sector en el más crítico e importante en el protocolo, para realizar un muestreo de ambientes, y así controlar posibles infecciones, [22].

6.9.2. Sector alimentos.

El control microbiológico de la producción de alimentos tiene como finalidad última suministrar productos seguros e inoctrinos, con una vida comercial adecuada y un costo razonable para el consumidor, [23].

La contaminación de los alimentos a partir del aire, es importante tanto por razones sanitarias como económicas. Algunos organismos patógenos especialmente los causantes de infecciones respiratorias, pueden llegar por medio del aire a los empleados de industrias alimenticias y a los mismos alimentos. El número total de microorganismos en

un alimento puede aumentar a causa del aire, al igual que las esporas de los hongos, que pueden ocasionar problemas graves de contaminación, es por ello que se hace fundamental un análisis microbiológico de estos ambiente, [24].

6.9.3. Sector general.

La calidad del aire en interiores se refiere a la contaminación del aire dentro de bibliotecas, salas de espera, edificios de oficinas y en zonas de gran afluencia de personas, causada por agentes microbiológicos, ocasionando efectos adversos en la salud a corto y largo plazo, [5].

El análisis del ambiente interior está cobrando más importancia en los últimos años y cada vez hay más información para prevenir las enfermedades que tiene su origen en espacios cerrados. No hay que olvidar que muchos profesionales pasan la totalidad de la jornada laboral en estos espacios, [25], y están expuestos a contaminantes directos como humo de tabaco, polvo de papel, disolventes, presencia de deterioro por humedades, pesticidas y siendo los más importantes los bioaerosoles entre los que se encuentran bacterias, hongos, virus, ácaros, excrementos y pelos de animales, [26].

Se considera que un ambiente interior sufre una contaminación biológica si contiene bioaerosoles que pueden causar enfermedad o efectos adversos para la salud como hipersensibilidad, irritación e inflamación de las mucosas etc. De las personas que se hallen en ese ambiente. La inhalación, ingestión, o el simple contacto con la piel, permite a los microorganismos transmitidos por bioaerosoles entrar en contacto con los seres humanos y producir diversas enfermedades.

En ambientes interiores se produce una parte de microorganismos por medio de las personas que están en ellos, por los sistemas de aire acondicionado y de distribución de agua, por focos de contaminación directa etc. Por otro lado, los edificio contienen en su interior muchos lugares que permiten el crecimiento de microorganismos, actuando como amplificadores de la contaminación biológica aportada, por tales razones, se ve la necesidad de realizar muestreos microbiológicos del aire en lugares donde se halla un flujo permanente de personas, [25].

6.10. Métodos de muestreo de los microorganismos en el aire.

El estudio de los microorganismos del aire, depende de las técnicas desarrolladas para la toma de muestras. Desde el siglo XIX comenzaron las investigaciones sobre estos organismos y se han diseñado diversidad de aparatos y técnicas para su análisis.

Los primeros métodos de muestreo de aire, fueron diseñados por Miquel y Cambert en 1901 como ya se habló anteriormente, siendo la base para los desarrollados en el siglo XX.

Actualmente, existen una gran cantidad de métodos e instrumentos para detectar los microbios en el aire, de los que se citan los más útiles y usuales. Las técnicas utilizadas son diversas, de las cuales, la sedimentación, filtración, el impacto sobre superficies sólidas y el borboteo en medios líquidos son las más importantes,[12].

6.10.1. Técnica de sedimentación por gravedad.

El método de sedimentación en placa Petri ha sido el más ampliamente utilizado desde que Frankland y Hart lo emplearan por primera vez en 1887. Las placas con medio de cultivo estéril, permanecen abiertas durante determinados periodo de tiempo, permitiendo la sedimentación de los microorganismos. Este método es sencillo y económico. Tienen la ventaja de que se pueden identificar de los cultivos los microorganismos viables, pero su interpretación es difícil porque no pueden relacionarse con el volumen del aire muestreado. La deposición varía con el tamaño y forma de microorganismo, la velocidad y la turbulencia del aire, [12].

6.10.2. Técnica de filtración.

La filtración se realiza a través de un material poroso, fibra de vidrio u otros filtros de membrana. Los filtros recogen los microorganismos por sedimentación, impacto, difusión o atracción electrostática dependiendo del tipo. Los filtros de membrana utilizados son de policarbonato, ésteres de celulosa o cloruros de polivinilo, con un diámetro de poro desde 0,01 a 10 μm , según la naturaleza de los bioaerosoles. Al realizar la filtración se han diseñado aparatos portátiles con una bomba de vacío y un flujo de aire determinado. Entre los problemas que se destacan, encontramos la pérdida de viabilidad de las células vegetativas debido a la desecación durante el muestreo. En las muestras obtenidas en los filtros de membrana, se pueden estudiar los microorganismos por microscopía o por cultivo, colocando los filtros en medios de cultivo sólido para determinar el número de colonias, [12].

6.10.3. Técnica de impacto sobre superficies sólidas.

Esta técnica es la más usada en la actualidad, los microorganismos se separan de la corriente de aire utilizando la inercia para forzar su sedimentación sobre las superficies sólidas. El proceso de impacto depende de las propiedades de inercia de la partícula (tamaño, densidad y velocidad) y de las propiedades físicas del aparato tales como las dimensiones de la boquilla y el recorrido del flujo de aire.

En la mayoría de dispositivos, los microorganismos quedan retenidos sobre un medio de cultivo sólido contenido en cajas Petri de distinto tamaño, en tiras de plástico y en placas de contacto. Después de la incubación se puede hacer el recuento e identificación de los microorganismos, [12].

6.10.4. Técnica de borboteo en líquidos.

El fundamento es similar al del impacto sobre medios sólidos y la fuerza de inercia es esencial para separar los microorganismos contenidos en el aire y que se depositan en el medio líquido, este medio también requiere una bomba de vacío.

Estos dispositivos hacen pasar el aire mediante un aspirador, a través de líquidos que retienen los microorganismos. Este líquido puede ser sembrado en placas para determinar el número de microorganismos y examinarse microscópicamente, [12].

6.11. Métodos de identificación.

6.11.1. Medios de cultivo.

Un medio de cultivo es un sustrato o solución de nutrientes en los que crecen y se multiplican los microorganismos en el laboratorio, con el objeto de aislar diferentes especies bacterianas, proceder a su identificación y llevar a cabo una serie de estudios complementarios. Los sustratos energéticos y la materia orgánica sintética pueden suministrarse por sustancias nutritivas contenidas en la maceración de la carne y vísceras. Los aminoácidos y péptidos los aportan las peptonas que contienen todos los productos de degradación de las proteínas, sin vitaminas, y su composición exacta varía según el tipo de sustrato y enzimas utilizados como pepsina, tripsina, papaína, entre otras. Los factores de crecimiento se suministran por maceración y adición de sangre, suero, extracto de levaduras, entre otros.

Los medios de cultivo deben contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y deben estar exentos de cualquier microorganismo contaminante. Contienen como mínimo: carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras, [30,31].

6.11.1.1. Clasificación.

Los medios de cultivo pueden clasificarse según su consistencia, origen, composición y utilización.

6.11.1.1.1. Según su consistencia.

Según su consistencia, los medios de cultivo se clasifican en líquidos, sólidos y semisólidos.

6.11.1.1.1.1. Líquidos.

Contiene los nutrientes antes citados, a los cuales se les adiciona una sustancia capaz de mantener el pH adecuado entre los más empleados están el caldo nutritivo y el caldo peptona, [30].

6.11.1.1.1.2. Sólidos.

Se obtiene agregando agar, sustancia polisacárida e inerte obtenida de las algas marinas del género *Gellidium*, en una concentración de 1,5 a 2,0 % a un medio líquido determinado. Las exigencias nutritivas y las condiciones fisicoquímicas son similares a las del medio líquido. Pero a diferencia de ellos, ofrecen la posibilidad de obtener colonias aisladas separadas unas de otras, [30].

6.11.1.1.1.3. Semisólidos.

Son muy semejantes a los medios sólidos, con la diferencia que a estos se les disminuye la concentración de agar agregado a 0,5%. Se utilizan para la conservación de cepas bacterianas y la observación y registro de bacterias móviles, [30].

6.11.1.1.2. Según su origen.

Según su origen, se dividen en medios sintéticos y medios naturales.

6.11.1.1.2.1. Medios sintéticos.

También llamados químicamente definidos, son medios compuestos por productos químicos conocidos y se usan para estudios metabólicos. Algunos ejemplos son el agar nutritivo, y el agar eosina azul de metileno (EMB), [30].

6.11.1.1.2.2. Medios naturales.

También llamados químicamente no definidos, son aquellos medios preparados a partir de sustancias naturales o vegetales, de composición no rigurosamente constante ejemplo: el suelo, la leche, la papa etc., [30].

6.11.1.1.3. Según su composición y utilización.

Según su utilización y composición los medios de cultivo se clasifican en: Simples, enriquecidos, selectivos, diferenciales, de enriquecimiento, de recuento y de transporte.

6.11.1.1.3.1. Medios simples.

Poseen los requisitos nutricionales mínimos para permitir el desarrollo bacteriano en general, ejemplo agar nutritivo, [30].

6.11.1.1.3.2. Medios enriquecidos.

Son medios simples, a los que se añaden ciertos componentes, como sangre, suero, huevo, glucosa, vitaminas entre otros, que permiten el aporte de factores de crecimiento o sustancias que neutralizan agentes inhibidores de crecimiento, en bacterias exigentes nutricionalmente. Son diferentes para cada tipo de bacteria, ejemplo agar sangre enriquecido con sangre; agar desoxicolato-lactosa (DLA), enriquecido con lactosa y desoxicolato, [30].

6.11.1.1.3.3. Medios selectivos.

Se consiguen añadiendo al agar nutritivo compuestos químicos nocivos para las bacterias cuyo crecimiento no interesa, o también alterando las condiciones físicas del medio. El cristal violeta, por ejemplo, impide el crecimiento de bacterias Gram positivas, sin afectar a las Gram negativas. Ejemplos, agar Mac Conkey que contiene cristal violeta; caldo lactosado bilis verde brillante (Caldo brila), selecciona bacterias del grupo coliforme, posee bilis que inhibe las Gram positivas y lactosa que favorece el crecimiento de los coliformes, [30].

6.11.1.1.3.4. Medios diferenciales.

A estos medios de cultivo se les añade sustancias para que solo crezcan determinadas bacterias, y estas, al actuar sobre algunas de las sustancias adicionadas, permiten observar macroscópicamente ciertas propiedades de crecimiento que ayudan a diferenciar sus colonias de otras especies diferentes. Como medios diferenciales se usan por ejemplo el agar eosina azul de metileno (EMB), que diferencia colonias de *Escherichia coli* (color verde metálico brillante), de las colonias de *Enterobacter aerogenes* (color rosado, consistencia mucosa y crecimiento abundante), [30].

6.11.1.1.3.5. Medios de enriquecimiento.

Son medios líquidos que favorecen o permiten la multiplicación de bacterias cuando la muestra obtenida es muy pobre. Ejemplo: el caldo de Tioglicolato favorece en crecimiento de bacterias anaerobias, [30].

6.11.1.1.3.6. Medios de recuento.

Se utilizan para determinar el contenido bacteriano de sustancias como leche, agua, carnes etc. El número de colonias resultantes del sembrado de la muestra, se cuentan macroscópicamente y, posteriormente, se aplican fórmulas matemáticas para obtener el resultado final, el cual se expresa como unidades formadoras de colonia (UFC). Ejemplo: el agar cuenta-gérmes (ACG) sirven para determinar el número total de bacterias que existen en una muestra, [30].

6.11.1.1.3.7. Medios de transporte.

Se utilizan para asegurar la viabilidad de las bacterias y evitar que se reproduzcan alterando el número de bacterias iniciales, desde el momento de la toma de la muestra hasta su posterior siembra en el laboratorio. Para evitar la reproducción de las bacterias estos medios no presentan fuentes de nitrógeno, que es un elemento indispensable para la división celular, por ejemplo el medio de Stuart, [30].

6.11.1.2. Medios de cultivo utilizados.

Los medios que se nombrarán a continuación, fueron los usados durante el presente trabajo.

6.11.1.2.1. Agar Actinomicetes.

Es un agar para el aislamiento de Actinomicetos, que con la adición de glicerol, permite el crecimiento de este tipo de microorganismos.

Contiene caceinato de sodio como fuente de nitrógeno y asparagina, que es un aminoácido, como fuente de nitrógeno orgánico. EL propionato de sodio es el sustrato utilizado para la fermentación anaeróbica. EL sulfato de magnesio y el sulfato ferroso, son fuente de sulfatos y de iones metálicos.

6.11.1.2.2. Agar Baird Parker (Baird Parker agar).

Medio de alta especificidad diagnóstica, selectivo y diferencial para el aislamiento y recuento de estafilococos coagulasa positiva.

En el medio de cultivo preparado y completo, la peptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono y nitrógeno, el extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B, la glicina y el piruvato estimulan el crecimiento de los estafilococos. Este medio de cultivo es selectivo y diferencial debido al telurito de potasio y al cloruro de litio, los cuales inhiben el desarrollo de la flora acompañante. Los estafilococos coagulasa positiva reducen el telurito a telurio y originan colonias de color grisáceo-negro, y dan reacción sobre la yema de huevo produciendo alrededor de la colonia una zona opaca que a menudo tiene una zona clara más externa. Se pueden encontrar cepas no lipolíticas, que presentan igual características de colonias pero sin la zona opaca y clara. Se debe confirmar la presencia de *S. aureus* mediante pruebas bioquímicas.

6.11.1.2.3. Agar base Brilliance *Bacillus cereus*.

El agar Brilliance *Bacillus cereus* es un medio cromogénico para el aislamiento y diferenciación de *Bacillus cereus* de muestras.

Este medio incorpora el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-glucopiranosido, que se rompe por la enzima beta-glucosidasa, presente en *Bacillus cereus* resultando la coloración azul/verde de las colonias. La polimixina B inhibe la mayoría de los organismos Gram negativos y algunos Gram positivos.

6.11.1.2.4. Agar base Brilliance Listeria.

El agar Brilliance Listeria es un medio para el aislamiento, enumeración y presuntiva identificación de algunas especies de *Listeria*.

Este agar utiliza el cromógeno X-glucósido para la identificación presuntiva de *Listeria spp.* Este cromógeno se rompe por la beta-glucosidasa que es común en todas las especies de *Listeria*. Otros microorganismos que poseen esta enzima como enterococos, son inhibidos por agentes selectivos dentro del medio: cloruro de litio, polimixina b y ácido nalidixico, mientras que la anfoterisina inhibe el crecimiento de cualquier tipo de mohos y levaduras presentes en la muestra.

Las colonias de *Listeria monocytogenes* se presentan de color azul/verde con la presencia de halo; mientras de las colonias de *Listeria innocua* se presentan del mismo color pero sin halo.

6.11.1.2.3.5. Agar base Ogye (Oxytetracyclin-Glucose-Yeast Extract Agar).

Este agar se usa para el aislamiento y enumeración de mohos y levaduras.

El medio base permite un buen crecimiento de levaduras y mohos, mientras que la Oxitetraciclina inhibe el crecimiento de bacterias.

6.11.1.2.6. Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Eosin methylene blue agar).

Es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia enterobacteriaceae. El agar EMB permite la diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo; esta diferenciación se da por los indicadores eosina y azul de metileno, los cuales ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Muchas cepas de *E.coli* y *Citrobacter spp.* Presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa, poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras. En este medio se obtiene un buen desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella* presentándose como colonias incoloras.

6.11.1.2.7. Agar Estándar Plate Count (Standard Plate Count Agar).

Es un medio de cultivo exento de sustancias inhibidoras y de indicadores, concebido esencialmente para la determinación de aerobios mesófilos en diversas muestras.

6.11.1.2.8. Agar Nutritivo (Nutrient Agar).

Es un medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales.

La pluripeptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano.

6.11.1.2.9. Agar Pseudomonas Cetrímide (Pseudomonas Cetrímide Agar).

Es un medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género.

Su formulación permite el crecimiento selectivo de *P. aeruginosa* y estimula la formación de pigmentos. Las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* crecen de un color amarillo verdoso a azulado, pero es necesaria la confirmación con incidencia de luz ultravioleta para observar su fluorescencia. La gelatina aporta nutrientes para el desarrollo microbiano, el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *P. aeruginosa*.

6.11.1.2.10. Caldo Fluorocult Lauril Sulfato (Fluorocult Laurylsulfato Bouillon).

Es un medio utilizado para la identificación de *E.coli*, mediante tres resultados confirmativos: producción de gas, fluorescencia y formación de anillo rojo tras la adición del reactivo de Kovacs.

Es un medio rico en nutrientes que permite un rápido crecimiento de los microorganismos fermentadores de la lactosa, aún de los fermentadores lentos.

La triptosa es la fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, las sales de fosfato proveen un sistema buffer, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Es un medio selectivo, ya que el Lauril

sulfato de sodio inhibe el desarrollo de la flora acompañante. Por la fermentación de la lactosa, se produce ácido y gas, este último se evidencia al utilizar las campanas Durham.

6.11.1.2.11. Medio selectivo Brilliance *E.coli*- coliforme.

Es un agar selectivo para la identificación simultánea de coliformes totales y *E.coli* en diferentes matrices. El contenido de lauril sulfato inhibe ampliamente el crecimiento de bacterias Gram positivas, sin tener influencias negativas sobre el crecimiento de coliformes.

Esta identificación se hace posible por la combinación de dos sustratos cromógenos. El sustrato salmón-GAL es escindido por la enzima beta-D-Galactosidasa característica de los coliformes y provoca una coloración roja de todas las colonias de coliformes. La identificación de la beta-d-Glucoronidasa característica para *E.coli* tiene lugar mediante el sustrato x-Glucorónido, cuyo producto de ruptura produce una coloración azul en las colonias positivas. Ya que *E.coli* rompe tanto salmon-GAL como x-Glucorónido, las colonias se tiñen de violeta a azul oscuro, y debido a ello son fáciles de diferenciar de las restantes coliformes que se tiñen de color rojo.

6.11.1.2.12. Medio XLD (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar).

Es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento de patógenos entéricos Gram negativos (*Salmonella* y *Shigella*). Contiene extracto de levadura como fuente de nutrientes y vitaminas. Utiliza el desoxicolato de sodio como agente selectivo, y, por consiguiente, inhibe los microorganismos Gram positivos. La xilosa se incorpora en el medio dado que la fermentan prácticamente todos los entéricos excepto *Shigella*, y esta propiedad hace posible la diferenciación de dicha especie. La lisina se incluye para permitir la diferenciación del grupo *Salmonella* de los organismos no patógenos, dado que sin lisina, *Salmonella* fermentaría rápidamente la xilosa y no se distinguiría de las especies no patógenas.

Las colonias de salmonella crecen de color rojo con centros negros mientras que las colonias de *Shigella* crecen rojas.

6.11.2. Tinciones.

Para las tinciones, se utilizan sales compuestas de un ión positivo y un ión negativo, uno de los cuales es coloreado y denominado cromóforo. En los llamados colorantes básicos es

el ión positivo y en los colorantes ácidos el negativo. A pH siete las bacterias tiene carga ligeramente negativo, y por lo tanto el ión positivo coloreado de un colorante básico es atraído por la célula bacteriana. Ejemplos de colorantes básicos son: Safranina, cristal violeta y azul de lactofenol. Los colorantes ácidos no son atraídos por la mayoría de las bacterias porque los iones negativos del colorante son repelidos por la superficie bacteriana cargada negativamente. De modo que el colorante tiñe el fondo de la preparación, denominándose tinción negativa. Ejemplos de colorantes ácidos son la eosina y la nigrosina.

Para aplicar los colorantes ácidos o básicos, se utilizan tres tipos de técnicas de tinción: simple, diferencial y especial, [18].

6.11.2.1. Tinciones simples.

Un colorante simple es una solución acuosa o alcohólica de un solo colorante básico, siendo su objetivo principal destacar el microorganismo entero, de modo que la morfología y las agrupaciones celulares resulten visibles. Algunos de los colorantes simples utilizados corrientemente en el laboratorio son el azul de metileno, violeta de genciana, la safranina y el azul de lactofenol, siendo este último el utilizado para la tinción de hongos, este destruye la flora acompañante del hongo, el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas y el azul algodón tiñe la quitina de las paredes fúngicas, produciendo así la coloración azul visible en el microscopio, [18,28].

6.11.2.2. Tinciones diferenciales.

En contraste con las tinciones simples, las tinciones diferenciales dan reacciones distintas con diferentes tipos de bacteria, y por lo tanto permiten distinguirlas. Las tinciones diferenciales utilizadas más frecuentemente para las bacterias son la tinción de Gram y la tinción de ácido-alcohol resistencia, [18].

6.11.2.2.1. Tinción de Gram.

La tinción de Gram fue desarrollada en 1884 por el bacteriólogo Danés Hans Christian Gram, quién buscaba visualizar las bacterias del tejido muscular. Para ello ensayó una serie de protocolos con colorantes histológicos diversos, hasta que eventualmente estableció el procedimiento que ahora se conoce como Tinción De Gram, que se utiliza en todo el mundo. Gram, observó que con su proceder, las bacterias se teñían de azul oscuro o de rojo. Ello se debía a la precipitación en el citoplasma celular del cristal violeta, con solución de Lugol; en algunas bacterias (Gram positivas) no podían extraerlo con

disolventes como el etanol o la acetona, mientras en otras (Gram negativas) sí que se extraía. Puesto que las Gram negativas no se teñían con el cristal violeta, se necesitaba una tinción de fondo con safranina. Hace relativamente poco tiempo, se demostró que la causa de la diferente extracción del complejo cristal violeta-yodo eran las diferencias estructurales de la pared celular.

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa rodeando la membrana citoplasmática; compuesto principalmente por peptidoglicano. Las Gram negativas poseen una pared celular más delgada que está rodeada de la membrana externa: Por lo tanto, los microorganismos Gram negativos poseen dos membranas. La membrana externa difiere de la interna y contiene una molécula conocida como lipopolisacárido, [18,32].

En la figura 4, se evidencia claramente la diferencia estructural de la pared celular entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

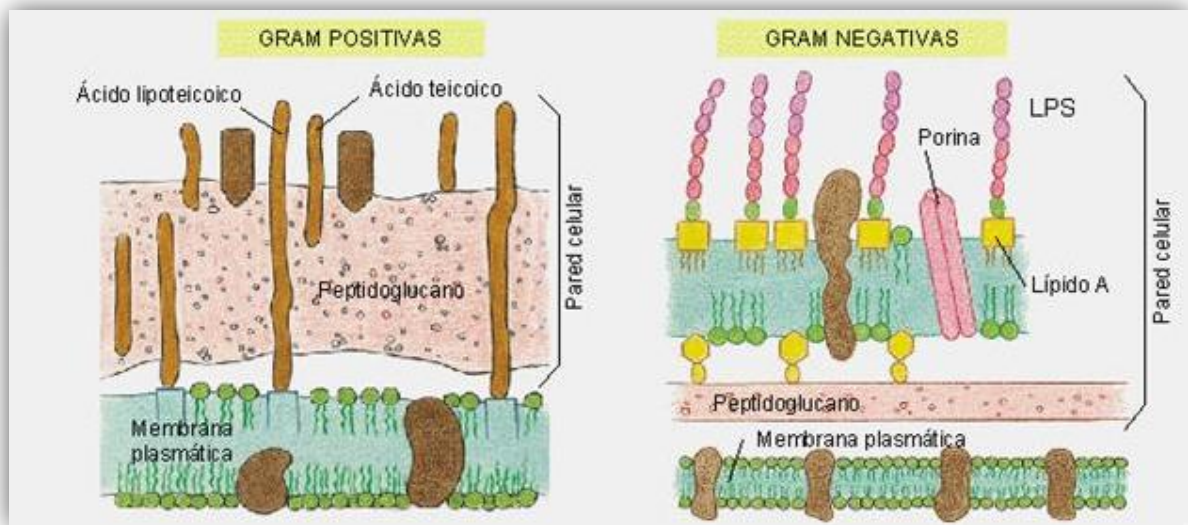


Figura 4. Diferencias estructurales de la pared celular entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En las figuras 5 y 6, se observa la diferencia de color entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas vistas desde un microscopio.



Figura 5. Bacterias Gram positivas.

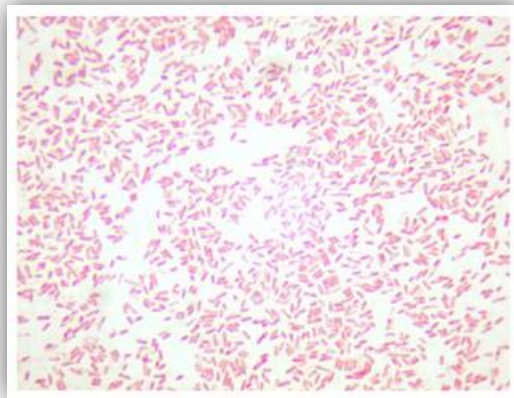


Figura 6. Bacterias Gram negativas.

6.11.2.3. Tinción especial

Las tinciones especiales, se utilizan para teñir aisladamente partes específicas de los microorganismos como endosporas y flagelos, y para poner en evidencia la presencia de cápsulas. Algunos tipos de tinción especiales son: Tinción negativa de cápsulas, tinción de esporas y endosporas, y tinción de flagelos, [18].

6.11.3. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

Las actividades enzimáticas son ampliamente utilizadas para diferenciar a las bacterias. Incluso las bacterias estrechamente relacionadas pueden ser separadas en especies diferentes mediante el empleo de pruebas bioquímicas, por ejemplo, para determinar su capacidad de fermentar un conjunto de carbohidratos seleccionados. Además, las

pruebas bioquímicas pueden proporcionar datos acerca del nicho de la especie en el ecosistema.

El tiempo necesario para identificar las bacterias puede reducirse de modos considerable si se emplean medios de cultivo selectivos y diferenciales, o métodos de identificación rápida, [18].

6.11.3.1. Kits de identificación.

Las herramientas de identificación rápida o kits de identificación, se fabrican para grupo de bacterias importantes desde el punto de vista médico. Estas herramientas están diseñadas para realizar varias pruebas bioquímicas de forma simultánea y poder identificar las bacterias en el transcurso de 4 a 24 horas. En ocasiones este sistema se le denomina sistema de identificación numérica, porque a los resultados de cada prueba se les asigna un número. En la mayoría de los equipos comerciales a los resultados de las pruebas se les asigna números que varían de 1 a 4 y que se basan en la confiabilidad relativa y en la importancia de cada prueba, y el total resultante se compara con una base de datos de microorganismos conocidos, [18].

Los kits utilizados en el desarrollo de este trabajo de grado fueron: RapID One System, y el Staphylasa test.

6.11.3.1.1. RapID One System.

El sistema RapID ONE de Remel es un micrométodo cualitativo que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de microorganismos médicamente importantes. Este sistema está formado por un panel que posee varios pocillos de reacción, que contienen reactantes deshidratados y los cuales se inoculan con una cantidad predeterminada de inóculo. Como inóculo que rehidrata e inicia las reacciones de prueba, se usa una suspensión del microorganismo en el líquido de inoculación RapID. Después de incubar el panel, se examina la reactividad de cada pocillo de prueba, observando el desarrollo de un color. El patrón resultante de puntuaciones positivas o negativas, se usa como base para identificar el microorganismo en estudio, comparando los resultados obtenidos con los patrones de reactividad almacenados en la base de datos. La información anteriormente descrita, fue suministrada por el proveedor del producto: Químicos y Reactivos SAS (QUIMIREL).

6.11.3.1.2. Staphylase test (coagulasa).

La característica generalmente aceptada para la identificación de *Staphylococcus aureus* es la capacidad de producir coagulasa (o factor de aglutinación). La presencia del factor de aglutinación puede ser detectada de varias maneras. El Staphylase test de Oxoid detecta la presencia de factor de aglutinación, mediante la aglutinación de los glóbulos rojos de la sangre de oveja. La información anteriormente descrita, fue suministrada por el proveedor del producto: Químicos y Reactivos SAS (QUIMIREL).

6.12. Instalaciones y equipos.

6.12.1. Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos.

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron las instalaciones del laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, un laboratorio adscrito a la Escuela de Tecnología Química de la Universidad Tecnológica de Pereira desempeñándose como un laboratorio de extensión en el que se realizan pruebas y ensayos tendientes al análisis físico-químico y microbiológico de materias primas, producto terminado, empaque, manipuladores y ambientes para el sector alimenticio enfocado al servicio de las empresas de la región; así para el análisis fisicoquímico y microbiológico de aguas (residual, doméstica e industrial, potable, subterránea, cruda entre otras).

En la figura 7, se detalla la ubicación geográfica del laboratorio de trabajo.

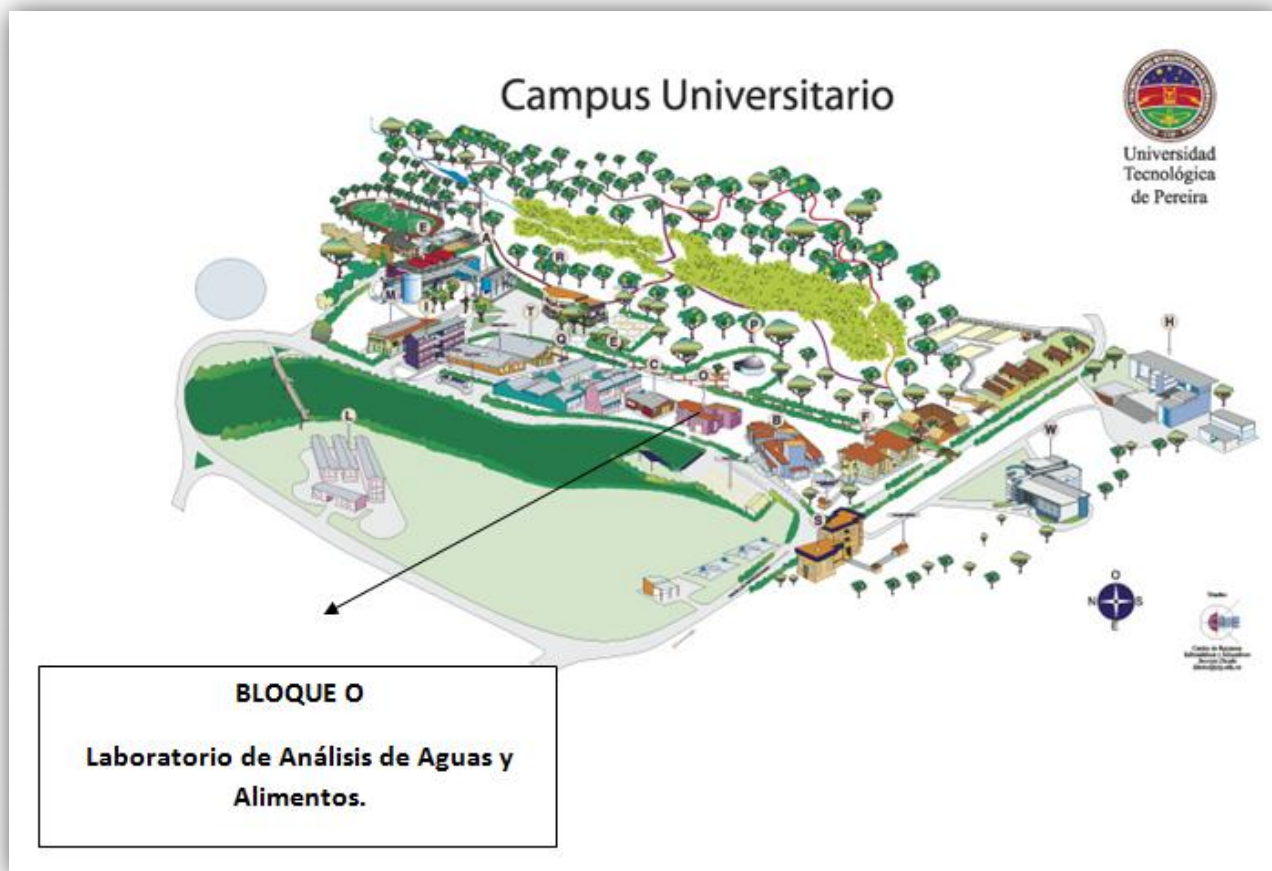


Figura 7. Ubicación geográfica del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

6.12.2. Equipos.

Los siguientes equipos fueron los utilizados durante el presente trabajo, éstos se encuentran ubicados en el laboratorio mencionado anteriormente.

6.12.2.1. Autoclave.

Para la esterilización de medios de cultivo y material de vidrio, se utilizó la autoclave de vapor en forma de olla eléctrica. Marca ALL AMERICAN, modelo 25. Ver figura 8.



Figura 8. Autoclave

6.12.2.2. Balanza Analítica.

Se utilizó la balanza analítica electrónica marca OHAUS con capacidad de 210 g x 0,0001 g. Ver figura



Figura 9. Balanza Analítica.

6.12.2.3. Cabina de seguridad biológica.

Se utilizó la cabina de flujo laminar vertical con filtro HEPA de 99.99% de eficiencia. Ver figura 10.

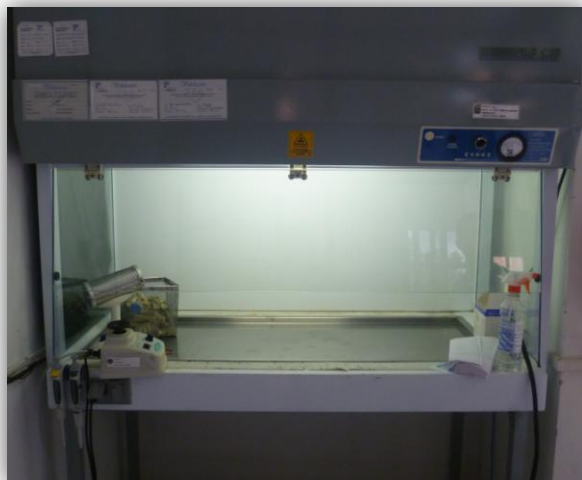


Figura 10. Cabina de seguridad biológica.

6.12.2.4. Cámara de observación ultravioleta.

Cabina de observación con dos longitudes de onda (254/366nm) con lámpara de luz ultravioleta de 8 W. Ver figura 11.



Figura 11. Cámara de observación ultravioleta.

6.12.2.5. Cuenta colonias.

Cuenta colonias para cajas de Petri modelo DIGITAL-S, marca COMECTA. Ver figura 12.

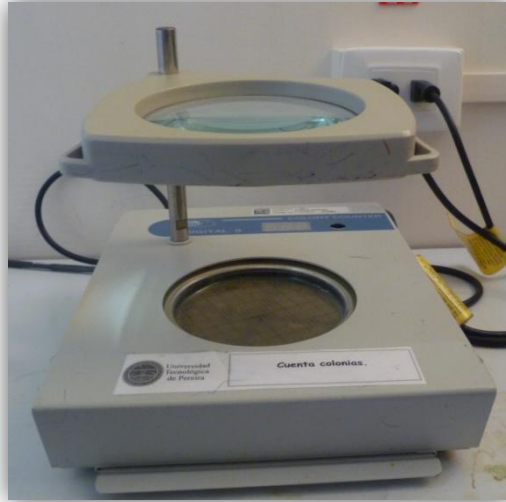


Figura 12. Cuenta colonias.

6.12.2.6. Horno.

Con el fin de esterilizar las cajas de Petri, se utilizó un Horno de marca MEMMERT. (Ver figura 13).



Figura 13. Horno.

6.12.2.7. Incubadoras.

Para permitir un óptimo crecimiento de los microorganismos, se utilizaron dos incubadoras, programadas a diferentes temperaturas.

6.12.2.7.1. Incubadora para mesófilos a 37 °C

Para incubar los microorganismos mesófilos que requieren una temperatura aproximada de crecimiento de 37 °C, se utilizó la incubadora microbiológica digital programable, modelo INCUDIGIT, marca SELECTA. Ver figura 14.



Figura 14. Incubadora para mesófilos.

6.12.2.7.2. Incubadora para hongos a 27 °C.

Para permitir un buen crecimiento de los hongos, se requiere una temperatura de aproximadamente 27 °C, para ello se utilizó la incubadora refrigerada de doble puerta de 220 L, modelo FOC 2251.



Figura 15. Incubadora para Hongos.

6.12.2.8. Microscopio.

Para observar la morfología microscópica de los microorganismos después de una respectiva tinción, se utilizó un microscopio binocular de cuatro objetivos y carro con desplazamiento, marca LEICA DM 500 FIJO. Ver figura 16.



Figura 16. Microscopio.

6.12.2.9. Nevera.

Para preservar los medios de cultivo estériles y otras preparaciones a una baja temperatura, se utilizó una nevera de 12 pies, marca CENTRALES. Ver figura 17.



Figura 17. Nevera.

7. METODOLOGIA

Los ensayos realizados se enfocaron en encontrar las mejores condiciones de muestreo para realizar un análisis de ambientes, y a su vez buscar los medios de cultivo óptimos que permitieran el crecimiento de los microorganismos de interés, para así generar un protocolo general el cual será probado en los sectores definidos anteriormente.

A continuación se describen las actividades específicas que se llevaron a cabo para lograr este cometido.

7.1. Ensayos generales para el análisis de las variables.

Para realizar el análisis de las variables (tiempo de exposición, número de cajas y su posición), se realizó un análisis de ambientes mediante el método de sedimentación por duplicado, utilizando los agares Ogye (O) y Plate Count (P), en un laboratorio de la Universidad tecnológica de Pereira con 15 días de diferencia, tiempo en el cuál se le realizó una desinfección por aspersión al laboratorio. Los ensayos se realizaron de 12 a 2 pm y con ausencia de personal.

7.1.1. Preparación de materiales.

Se inició con el lavado de las cajas de Petri, que posteriormente fueron empacadas y esterilizadas.

7.1.2. Preparación de medios de cultivo.

Siguiendo las indicaciones de los medios de cultivo (ver anexos 1-11), se preparó la cantidad necesaria de cada agar, realizando su posterior esterilización en el autoclave. Después de preparados, se realizó el vertimiento del medio en las cajas de Petri, al interior de la cabina de seguridad biológica.

Es importante resaltar, que el proceso de preparación de material, de esterilización y vertimiento de todos los medios de cultivo, utilizados durante el desarrollo del trabajo experimental, se llevó a cabo utilizando los mismos equipos mencionados anteriormente.

7.1.3. Incubación de muestras.

Terminado el tiempo sedimentación de los microorganismos en los medios de cultivo, se procede a incubarlos dependiendo de la naturaleza del agar; es así como los microorganismos que crecen en el agar Ogye, se debe incubar durante 5 días a 28 °C, a diferencia de los demás agares usados que se incuban durante 48 horas a 37°C.

7.1.4. Realización de los ensayos.

Para ambos análisis se utilizaron un total de 222 cajas de Petri, de las cuales 111 contenían agar Plate Count (P) y las 111 restantes con agar Ogye (O); los agares fueron usados con el fin de determinar el crecimiento a diferentes alturas, tiempos y posiciones; para lo cual se dividió el laboratorio en cuatro sectores (A,B,C,D) y en tres subsectores (I, II,III) para A,B y C; en el caso del sector D que corresponde a las esquinas se utilizó la nomenclatura D₁, D₂,D₃,D₄. Ver figura 18.

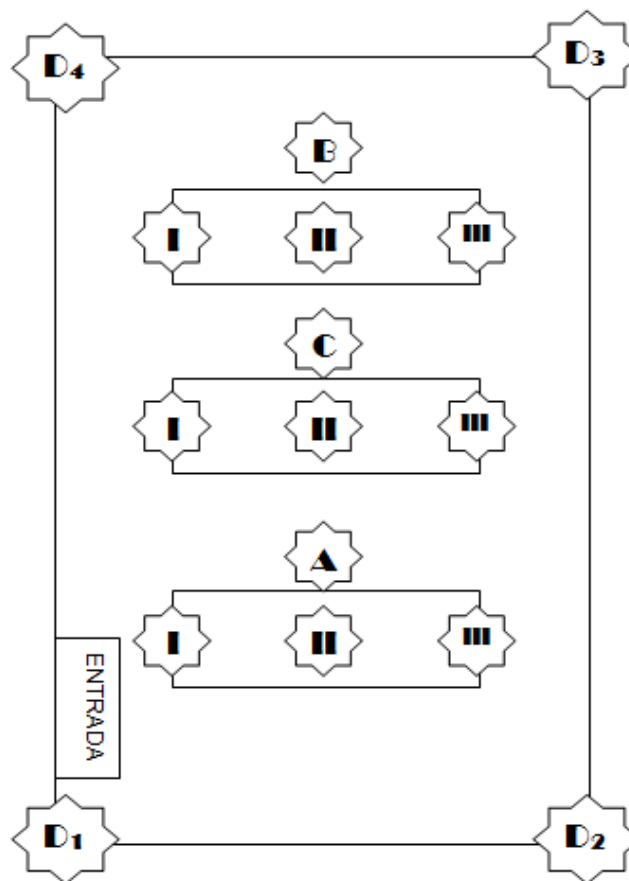


Figura 18. Sectores y subsectores del laboratorio.

Las cajas fueron posicionadas a tres diferentes alturas: baja (S), media (M) y alta (H), a excepción del sector C, donde no existía un lugar adecuado para ubicar las cajas en la altura (H), por lo que solo se trabajó posicionando las cajas en (S y M). Las alturas que se observan en la tabla 2, son el promedio en metros de la distancia desde el piso hasta el lugar de ubicación de las cajas en el laboratorio en donde se realizó el análisis.

POSICIÓN	ALTURA (m)
Baja (S)	0
Media (M)	1
Alta (H)	1,80

Tabla 2. Posición y altura de las cajas de Petri.

La variable tiempo se analizó en un rango de dos horas, exponiendo las cajas al ambiente por treinta minutos (3), una hora (1) y dos horas (2).

De las 222 cajas, 6 fueron utilizadas para control de esterilidad del medio (3 del agar O y 3 del agar P), dando un total de 216 cajas, ubicadas en el laboratorio en los subsectores (I,II y III) de los sectores (A,B y C). Es de aclarar que en el sector D no se utilizó la distribución de los subsectores, ya que se trataba de las 4 esquinas. Posicionadas las cajas en los subsectores, se procedió a ubicarlas en las diferentes alturas y a los diferentes tiempos, usando un total de 6 cajas de Petri por cada posición (3 del agar O y 3 del agar P).

Para rotular las cajas de Petri, se hace uso de una nomenclatura en la que se incluyen todas las iniciales mencionadas anteriormente. Por ejemplo: se tiene una caja rotulada con el código A-I-M-1-P; lo que significa que está en el sector A (A), subsector I (I), altura media (M), con una hora de exposición (1) y agar Plate Count (P), (ver figura 19), en la cual la estrella denota la posición exacta de la caja que refiere la nomenclatura anterior.

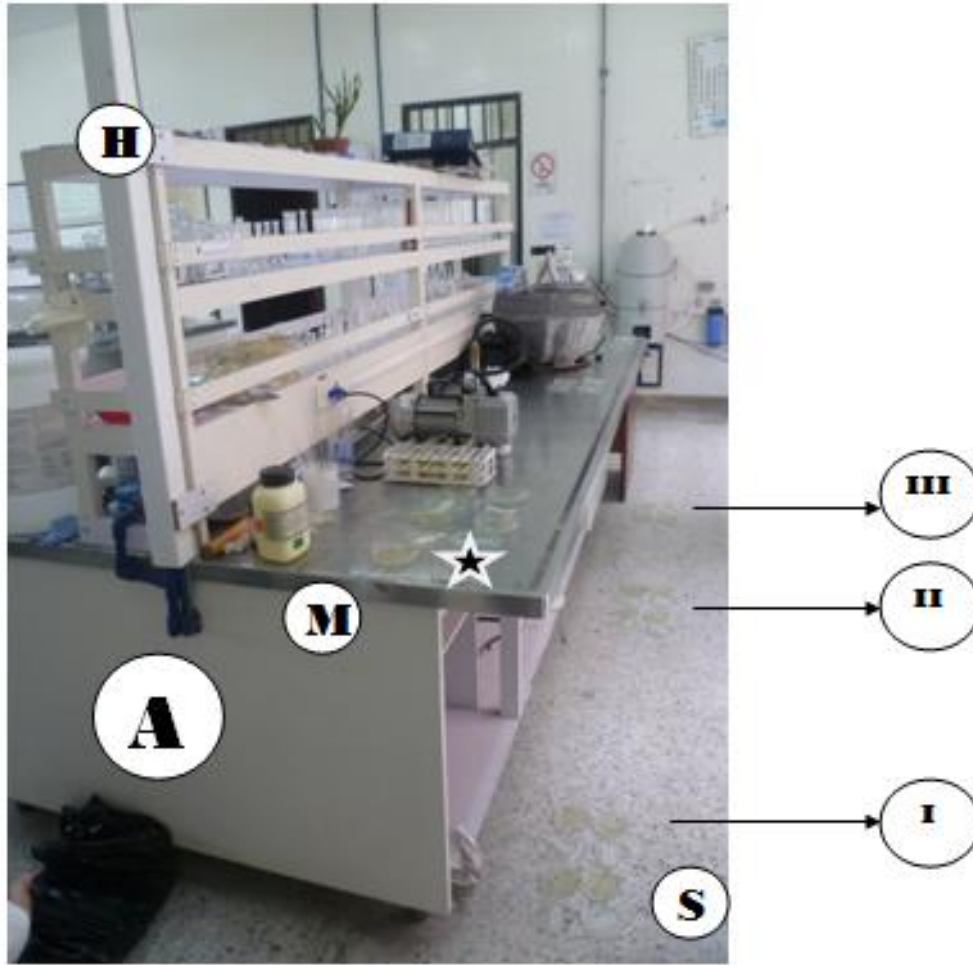


Figura 19. Ubicación de las cajas de Petri en el laboratorio

7.2. Ensayos con diferentes tipos de agar.

Con el fin de determinar los tipos de agar a usar en el protocolo general, y para observar el crecimiento de los microorganismos en los medios de cultivo, se realizaron dos ensayos con cinco agares diferentes: Plate Count (P), Baird Parker (B), Cetrimide (C), EMB (E), Ogye (O). Para realizar ambas pruebas, se siguió el mismo procedimiento citado en los numerales 7.1.1, 7.1.2. y 7.1.3.

7.2.1. Ensayo con diferentes tipos de agar en un laboratorio.

Uno de los análisis se realizó en el mismo laboratorio donde se llevaron a cabo los ensayos referidos en el numeral 7.1; exponiendo las cajas de Petri durante media hora, a una altura media distribuidos en cinco puntos del laboratorio. (Ver figura 20).

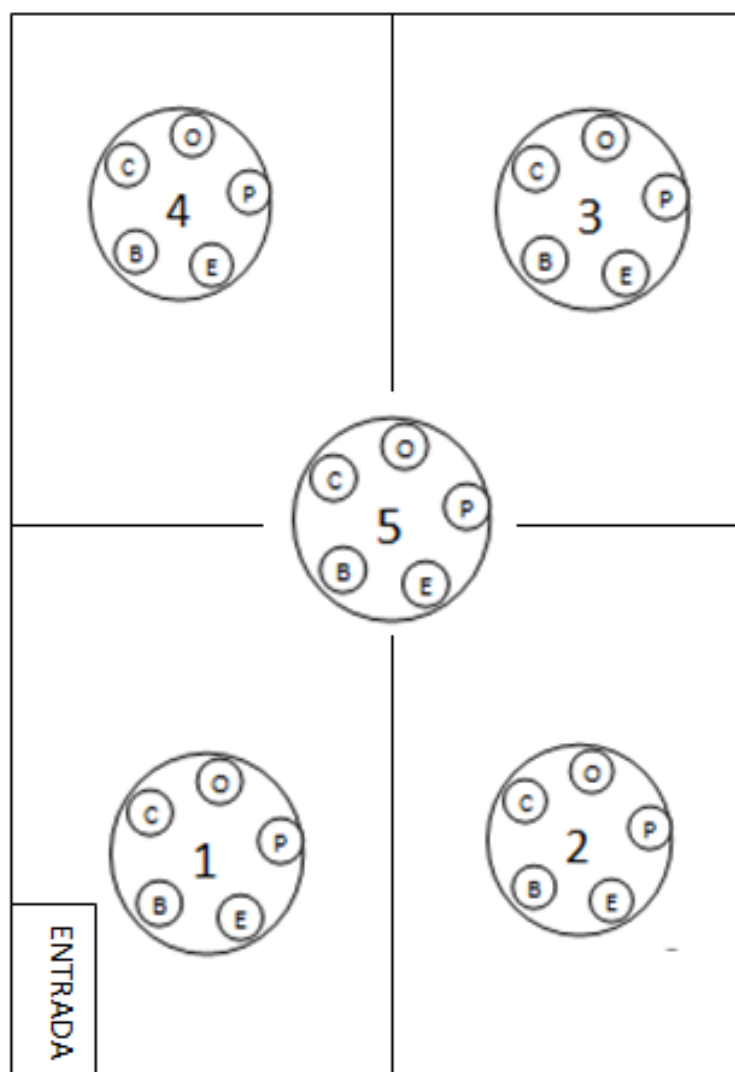


Figura 20. Distribución de los diferentes agares en el laboratorio

En la figura 21 se ejemplifica la distribución de los agares en una parte del laboratorio, en este caso se observa el sector 1 y 2.

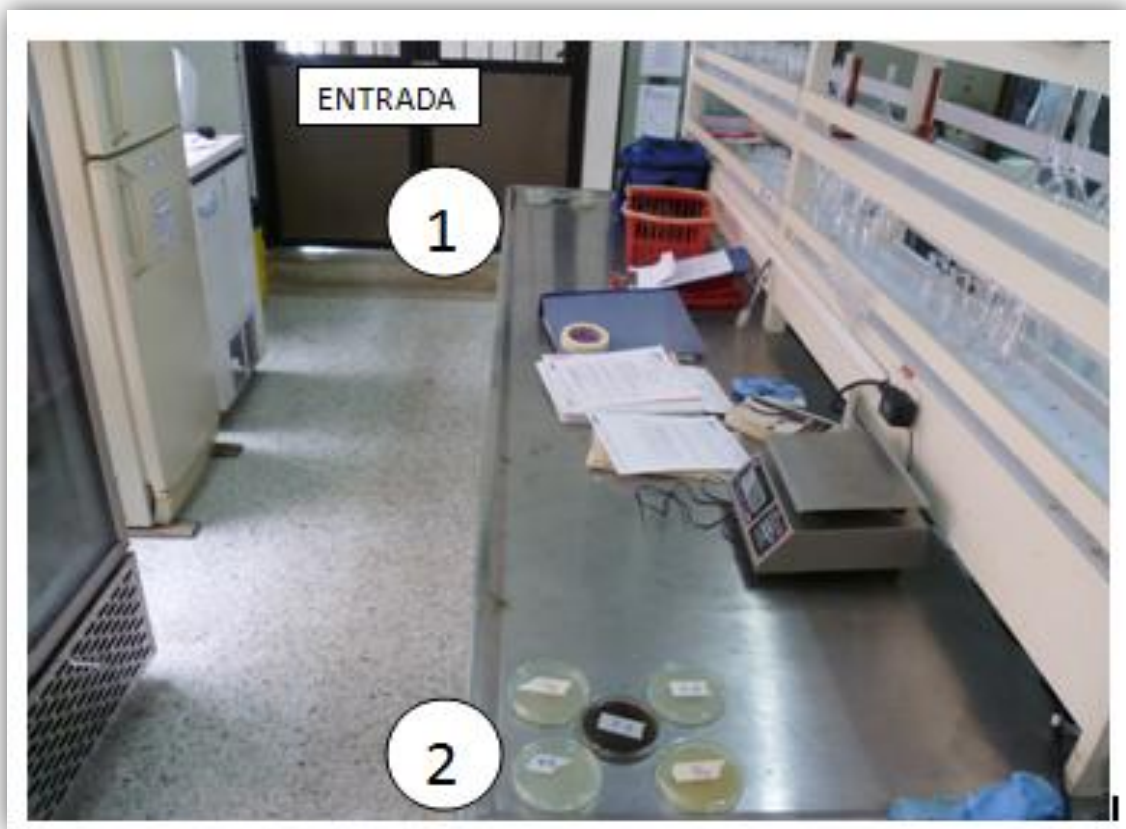


Figura 21. Sectores 1 y 2 del laboratorio con agares específicos

7.2.2. Ensayo con los diferentes tipos de agar en un baño.

Esta prueba se ejecutó en un baño de la Universidad Tecnológica de Pereira con el fin de obtener un crecimiento microbiano en los medios de cultivo específicos, ya que por conocimientos previos, se sabe que los baños son un foco de contaminación microbiana.

El análisis se realizó con los cinco agares mencionados anteriormente. Cuatro de ellos se ubicaron en los tanques sanitarios existentes y uno de ellos se ubicó entre la zona del lavamanos y los orinales.

Las cajas se dejaron expuestas durante media hora y se permitió el flujo normal de personas.

La figura 22 muestra claramente el lugar de ubicación de uno de los agares, en este caso el agar EMB (E).



Figura 22. Agar EMB sobre un tanque de sanitario.

7.3. Ensayo con dos agares para posterior repique y tinción.

Se siguen los mismos procedimientos citados en los numerales 7.1.1., 7.1.2 y 7.1.3., para preparación de material, preparación de medios de cultivo e incubación de muestras.

La prueba se realizó con los medios Plate Count (P) y Ogye (O) en el laboratorio referido en el numeral 7.1, a una altura media, durante media hora y en las cinco posiciones observadas en la figura 20.

7.3.1. Procedimiento para realizar una tinción de Gram.

En la figura 23 se describe el procedimiento a seguir para realizar una tinción de Gram.

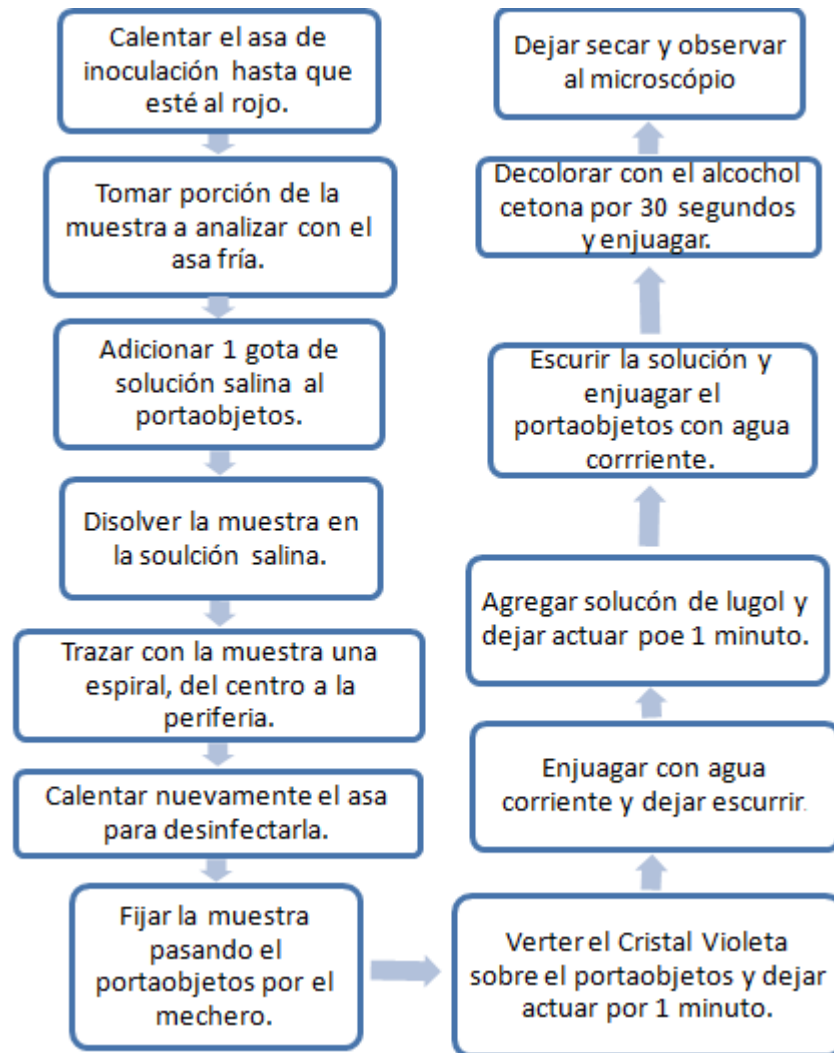


Figura 23. Procedimiento para realizar una tinción de Gram, [27].

7.3.2. Pruebas con agar Plate Count.

Luego del tiempo de incubación requerido, se procedió a hacer un repique en agar Nutritivo (N) de las colonias obtenidas del agar Plate Count, cuya morfología macroscópica era diferente; y luego realizar una tinción de Gram a las colonias puras, siguiendo el procedimiento descrito en la figura 23, con el fin de identificar la morfología microscópica, y de acuerdo a los resultados obtenidos, efectuar un repique en un agar específico que permitiera el aislamiento y la identificación del microorganismo.

7.3.3. Pruebas con agar Ogye.

Pasado el tiempo de incubación necesario, se procedió a realizar una tinción de hongos con el reactivo azul de lactofenol.

7.4. Segundo ensayo con diferentes tipos de agar en el baño.

Esta prueba se realizó con el objetivo de observar el crecimiento bacteriano en nuevos agares y realizar identificación de algunas bacterias mediante un kit de pruebas bioquímicas, entre otros.

Se realizó en el mismo sitio y siguiendo las condiciones mencionadas en el numeral 7.2.2. En este caso utilizando ocho medios de cultivo: Brillance Listeria (BL), Brillance Bacillus Cereus (BB), Cromocult (Cr), XLD (X), y los demás que habían sido empleados en la prueba anterior (E, P, B, C).

7.5. Análisis de Actinomicetos.

Se realizó una prueba con el objetivo de visualizar el crecimiento de los Actinomicetos en dos tipos de Agar, uno de ellos, específico para este tipo de microorganismos: agar Actinomicetos (AC), y el otro, un agar utilizado en el semillero de suelos GEA (grupo de estudio Agrícola), denominado agar Avena (AV). Esta se realizó en cuatro sitios de la Universidad Tecnológica de Pereira: Aire libre, un baño, zona de trabajo de un laboratorio de suelos y zona de tamizado de un laboratorio de suelos, la duración de la prueba fue de media hora, utilizando en cada lugar una caja por agar. En la figura 24 se observa uno de los lugares donde se realizó el análisis, en este caso en la zona de trabajo de un laboratorio de suelos.



Figura 24. Análisis de Actinomicetos en la zona de trabajo de un laboratorio de suelos.

7.6. Elaboración del protocolo general.

Con los resultados obtenidos de las anteriores pruebas, se elaboró un protocolo general para el muestreo microbiológico de ambientes, que posteriormente fue probado en el sector salud, sector alimentos y sector general, con el objetivo de verificar la existencia de los microorganismos de interés para este trabajo, los cuales fueron identificados mediante los kits Rapid ONE System y el Staphylase test.

Para mayor claridad sobre el ensayo del protocolo general en los sectores especificados, se recomienda ver el numeral 9.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS

8.1. Resultados de los ensayos generales para el análisis de las variables.

Pasado el tiempo de incubación, se procedió a hacer un recuento de las colonias obtenidas en los diferentes puntos de ubicación, alturas y tiempo, utilizando el cuenta colonias; los resultados se muestran a continuación.

Algunos resultados se presentan con el símbolo (*), representando que el número de colonias era incontable.

8.1.1. Resultados primer ensayo general.

8.1.1.1. Resultados con agar Plate Count.

En las tablas 3-6, se presenta el recuento de las unidades formadoras de colonia por placa (UFC/Placa), de cada sector con el agar Plate Count.

SECTOR A			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
A-I-S-P	10	17	37
A-I-M-P	7	14	*
A-I-H-P	2	12	12
A-II-S-P	13	6	22
A-II-M-P	9	9	20
A-II-H-P	4	8	*
A-III-S-P	8	16	32
A-III-M-P	6	8	16
A-III-H-P	3	11	18

Tabla 3. Resultados primer ensayo general Sector A- Plate Count.

SECTOR B			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
B-I-S-P	33	26	30
B-I-M-P	11	11	27
B-I-H-P	4	26	27
B-II-S-P	15	13	20
B-II-M-P	12	5	19
B-II-H-P	7	14	15
B-III-S-P	19	10	18
B-III-M-P	3	10	11
B-III-H-P	5	10	6

Tabla 4. Resultados primer ensayo general Sector – Plate Count.

SECTOR C			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
C-I-S-P	34	22	31
C-I-M-P	10	13	18
C-II-S-P	5	34	29
C-II-M-P	9	10	14
C-III-S-P	4	11	14
C-III-M-P	8	9	10

Tabla 5. Resultados primer ensayo general Sector C- Plate Count.

SECTOR D			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
D1-S-P	11	29	54
D1-M-P	9	13	18
D1-H-P	8	6	9
D2-S-P	394	15	20
D2-M-P	22	8	6
D2-H-P	3	5	15
D3-S-P	6	8	14
D3-M-P	8	12	15
D3-H-P	4	6	8
D4-S-P	5	16	23
D4-M-P	13	11	32
D4-H-P	10	11	39

Tabla 6. Resultados primer ensayo general Sector D- Plate Count.

8.1.1.2. Resultados con agar Ogye.

En las tablas 7-10, se presenta el recuento de las unidades formadoras de colonia por placa (UFC/Placa), de cada sector con el agar Ogye.

SECTOR A			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
A-I-S-O	37	*	*
A-I-M-O	29	40	51
A-I-H-O	35	*	78
A-II-S-O	26	35	61
A-II-M-O	27	37	44
A-II-H-O	*	*	38
A-III-S-O	27	43	*
A-III-M-O	25	31	60
A-III-H-O	*	39	54

Tabla 7. Resultados primer ensayo general Sector A- Ogye.

SECTOR B			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
B-I-S-O	26	36	68
B-I-M-O	34	46	67
B-I-H-O	31	56	*
B-II-S-O	20	24	73
B-II-M-O	27	38	69
B-II-H-O	23	*	*
B-III-S-O	23	31	46
B-III-M-O	20	36	59
B-III-H-O	30	58	*

Tabla 8. Resultados primer ensayo general Sector B- Ogye.

SECTOR C			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
C-I-S-O	33	48	72
C-I-M-O	26	37	*
C-II-S-O	16	40	59
C-II-M-O	29	40	64
C-III-S-O	22	32	51
C-III-M-O	29	46	77

Tabla 9. Resultados primer ensayo general Sector C- Ogye.

SECTOR D			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
D1-S-O	33	50	76
D1-M-O	22	39	79
D1-H-O	27	46	57
D2-S-O	34	34	55
D2-M-O	23	31	60
D2-H-O	*	56	64
D3-S-O	24	24	39
D3-M-O	29	63	57
D3-H-O	17	27	56
D4-S-O	15	42	53
D4-M-O	39	67	91
D4-H-O	27	53	66

Tabla 10. Resultados primer ensayo Sector D- Ogye.

8.1.2. Análisis de resultados del primer ensayo general.

Con el fin de observar la influencia en el crecimiento bacteriano, de las variables “tiempo de exposición” y “altura de las cajas”, se realizaron dos análisis en los que se tomó como constante una de las variables.

Cabe anotar que estos análisis, solo se realizaron con las colonias obtenidas en el agar Plate Count, debido a que el crecimiento fúngico en el agar Ogye se presentó de una manera excesiva, dadas las condiciones de contaminación del laboratorio y no fue posible realizar el mismo procedimiento. Para evidencia de esto, se observa en la figura 25, el alto crecimiento de hongos en el medio de cultivo.

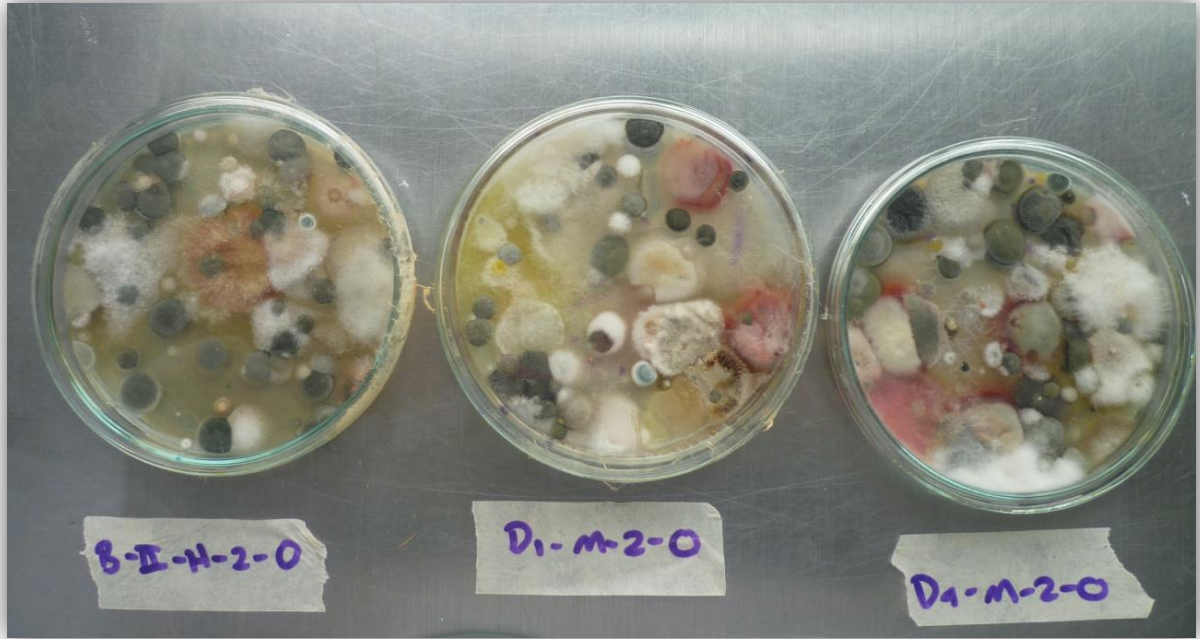


Figura 25. Crecimiento en el agar Ogye- Primer ensayo general.

Este crecimiento, es la muestra clara de que un lugar que presuntamente no está contaminado puede tener gran cantidad de microorganismos en su ambiente, alterando de alguna u otra manera la salud de las personas que frecuentan el lugar; es por ello que es de vital importancia realizar este tipo de pruebas regularmente.

8.1.2.1. Diferente altura VS tiempo constante.

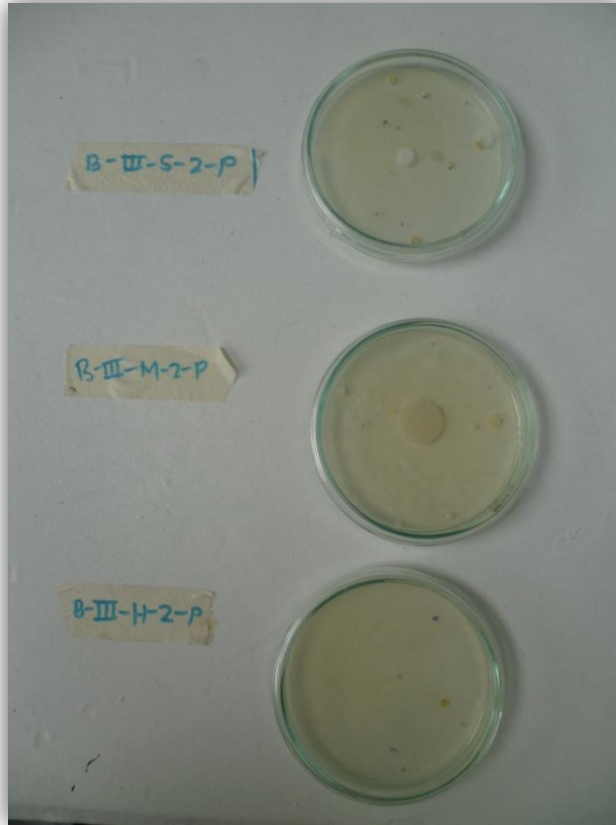
El objetivo de este análisis era determinar la incidencia de la altura en el crecimiento bacteriano, tomando como referencia el mismo tiempo de exposición. En algunos de los estudios individuales se presenta el símbolo (⊖), significando que según el número de colonias, no se podía concluir. En la tabla 11 se presenta la influencia de la altura en el crecimiento bacteriano.

			30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
SECTOR A	SUBSECTOR	I	S>M>H	S>M>H	S>M>H
		II	S>M>H	M>S>H	S>M>H
		III	S>M>H	S>M>H	S>M>H
SECTOR B	SUBSECTOR	I	S>M>H	∅	S=M=H
		II	S>M>H	∅	S>M>H
		III	S>M>H	S=M=H	S>M>H
SECTOR C	SUBSECTOR	I	S>M	S>M	S>M
		II	M>S	S>M	S>M
		III	M>S	S>M	S>M
SECTOR D	SUBSECTOR	D1	S>M>H	S>M>H	S>M>H
		D2	S>M>H	S>M>H	S>M>H
		D3	M>S>H	M>S>H	M>S>H
		D4	M>S>H	S>M>H	H>M>S

Dónde S, M y H son las posiciones baja, media y alta respectivamente; (>) simboliza mayor presencia de UFC/Placa, y (∅) simboliza que no se puede concluir.

Tabla 11. Influencia de la altura en el crecimiento bacteriano- Primer ensayo general.

Como se observa en la tabla 11, la mayoría de los datos concuerdan en que se obtiene una mayor recuperación bacteriana a nivel del piso (S); y que en la altura (H), el crecimiento es mucho menor. Esto se evidencia con la figura 26, en la que ilustran tres placas expuestas al aire por un tiempo de 2 horas, a diferentes alturas, y se nota claramente la diferencia de crecimiento en cada una.



*Figura 26. Diferencia de crecimiento bacteriano a diferentes alturas con tiempo constante-
Primer ensayo general*

8.1.2.2. Diferente tiempo VS altura constante.

El objetivo de este análisis era determinar la incidencia del tiempo de exposición de las cajas de Petri en el crecimiento bacteriano, tomando como referencia la misma altura. En algunos de los estudios individuales se presenta el símbolo (⊖), significando que según el número de colonias, no se podía concluir. En la tabla 12 se presenta la influencia del tiempo de exposición en el crecimiento bacteriano.

			S	M	H
SECTOR A	SUBSECTOR	I	2>1>30	☉	2=1=30
		II	2>30>1	2>1>30	☉
		III	2>1>30	2>1>30	2>1>30
SECTOR B	SUBSECTOR	I	30>2>1	2=1=30	2>1>30
		II	2>30>1	2>30>1	2>1>30
		III	30>2>1	2>1>30	1>2>30
SECTOR C	SUBSECTOR	I	30>1>2	2>1>30	-
		II	1>2>30	2>1>30	-
		III	2>1>30	2>1>30	-
SECTOR D	SUBSECTOR	D1	2>1>30	2>1>30	2>30>1
		D2	2>30>1	30>1>2	2>1>30
		D3	2>1>30	2>1>30	2>1>30
		D4	2>1>30	2>30>1	2>30>1

Dónde 30 son 30 min., 1 es 1 hora y 2 son 2 horas de exposición; (>) simboliza mayor presencia de UFC/Placa, y (☉) simboliza que no se puede concluir.

Tabla 12. *Influencia del tiempo de exposición en el crecimiento bacteriano- Primer ensayo general.*

Como se observa en la tabla 12, la mayoría de los datos concuerdan en que se obtiene una mayor recuperación bacteriana con un tiempo de exposición de 2 horas, y que en 30 minutos, el crecimiento es mucho menor. Esto se evidencia con la figura 27, en la que ilustran tres placas en la posición (S), con diferentes tiempos de exposición, y se nota claramente la diferencia de crecimiento en cada una.

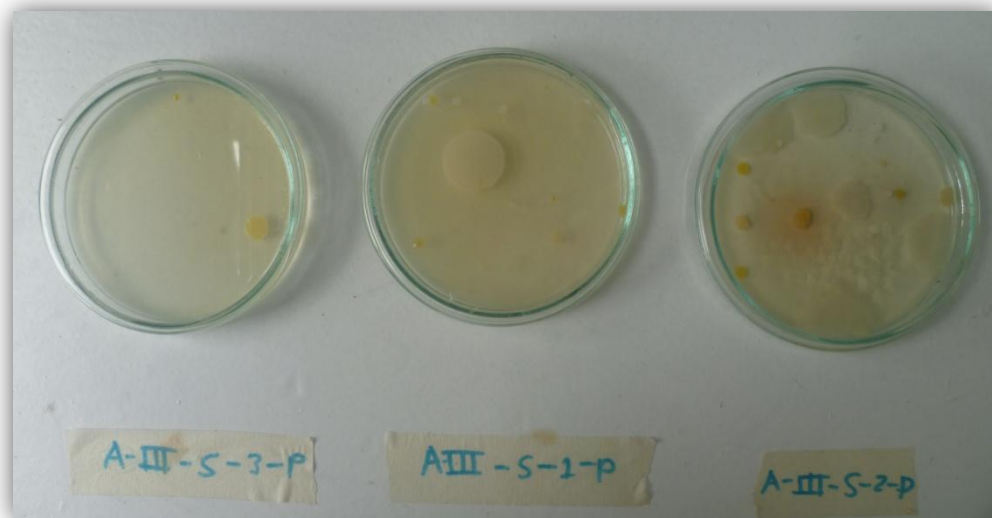


Figura 27. Diferencia del crecimiento bacteriano a diferente tiempo de exposición y altura constante- Primer ensayo general.

8.1.3. Resultados segundo ensayo general.

8.1.3.1. Resultados con agar Plate Count.

En las tablas 13-16, se presenta el recuento de las unidades formadoras de colonia por placa (UFC/Placa), de cada sector con el agar Plate Count.

SECTOR A			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
A-I-S-P	31	26	25
A-I-M-P	7	5	15
A-I-H-P	6	17	24
A-II-S-P	16	18	22
A-II-M-P	3	8	7
A-II-H-P	3	4	7
A-III-S-P	10	30	29
A-III-M-P	6	5	8
A-III-H-P	2	2	2

Tabla 13. Resultados segundo ensayo general Sector A- Plate Count.

SECTOR B			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
B-I-S-P	10	15	*
B-I-M-P	5	8	24
B-I-H-P	2	9	13
B-II-S-P	14	13	37
B-II-M-P	7	12	*
B-II-H-P	4	11	*
B-III-S-P	*	21	14
B-III-M-P	3	3	19
B-III-H-P	1	6	6

Tabla 14. Resultados segundo ensayo general Sector B- Plate Count.

SECTOR C			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
C-I-S-P	21	3	24
C-I-M-P	3	8	28
C-II-S-P	10	5	13
C-II-M-P	9	*	5
C-III-S-P	5	6	12
C-III-M-P	2	3	14

Tabla 15. Resultados segundo ensayo general Sector C- Plate Count.

SECTOR D			
NOMENCLATURA DE CADA PLACA	UFC/PLACA		
	30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
D1-S-P	12	21	38
D1-M-P	8	8	27
D1-H-P	4	4	20
D2-S-P	3	10	14
D2-M-P	2	3	7
D2-H-P	7	7	13
D3-S-P	5	21	29
D3-M-P	1	*	16
D3-H-P	0	6	14
D4-S-P	1	11	23
D4-M-P	7	4	17
D4-H-P	8	7	15

Tabla 16. Resultados segundo ensayo general Sector D- Plate Count.

8.1.3.2. Resultados con agar Ogye.

Para este segundo ensayo, no se reportan datos de las colonias obtenidas en el agar Ogye, debido a que por motivos de fuerza mayor, el ingreso de los estudiantes a la Universidad Tecnológica de Pereira fue restringido y por ende los hongos presentes en las placas continuaron su crecimiento, hasta el extremo de crecer por fuera de ellas; tornando poco representativos los resultados, aparte de ser una práctica peligrosa para los analistas por la presencia de esporas fúngicas. (Ver figura 28).



Figura 28. Crecimiento en el agar Ogye- Segundo ensayo general.

8.1.4. Análisis de resultados segundo ensayo general.

El análisis de resultados para las colonias obtenidas en el agar Plate Count del segundo ensayo general, se realizó de la manera descrita en el numeral 8.1.2.

8.1.4.1. Diferente altura VS tiempo constante.

El fundamento del análisis es igual al expuesto en el numeral 8.1.2.1. En la tabla 17 se presenta la influencia de la altura en el crecimiento bacteriano.

			30 MINUTOS	1 HORA	2 HORAS
SECTOR A	SUBSECTOR	I	S>M>H	S>H>M	H>M>S
		II	S=M=H	S>M>H	S=M=H
		III	S>M>H	S>M>H	S>M>H
SECTOR B	SUBSECTOR	I	S>M>H	S>H>M	S>M>H
		II	S>M>H	S>M>H	☉
		III	S>M>H	S>H>M	M>S>H
SECTOR C	SUBSECTOR	I	S>M	M>S	M>S
		II	S>M	S>M	S>M
		III	S>M	S>M	S>M
SECTOR D	SUBSECTOR	D1	S>M>H	S>M>H	S>M>H
		D2	H>M>S	S>H>M	S>H>M
		D3	S>M>H	M>S>H	S>M>H
		D4	H>M>S	S>H>M	S>M>H

Dónde S, M y H son las posiciones baja, media y alta respectivamente; (>) simboliza mayor presencia de UFC/Placa, y (☉) simboliza que no se puede concluir.

Tabla 17. Influencia de la altura en el crecimiento bacteriano- Segundo ensayo general.

Como se observa en la tabla 17, la mayoría de los datos concuerdan en que se obtiene una mayor recuperación bacteriana a nivel del piso (S); y que en la altura (H), el crecimiento es mucho menor. Obteniendo el mismo resultado que el primer ensayo general.

8.1.4.2. Diferente tiempo VS altura constante.

El fundamento del análisis es igual al expuesto en el numeral 8.1.2.2. En la tabla 18 se presenta la influencia del tiempo de exposición el crecimiento bacteriano.

			S	M	H
SECTOR A	SUBSECTOR	I	2>1>30	2>30>1	2>30>1
		II	2>1>30	1>2>30	2>1>30
		III	2>1>30	2>1>30	☉
SECTOR B	SUBSECTOR	I	2>1>30	2>1>30	2>1>30
		II	2>30>1	2>1>30	2>1>30
		III	30>1>2	2=1=30	2=1=30
SECTOR C	SUBSECTOR	I	☉	2>1>30	-
		II	2>30>1	2>1>30	-
		III	2>1>30	2>1>30	-
SECTOR D	SUBSECTOR	D1	2>1>30	2=1=30	2=1=30
		D2	2>1>30	2>1>30	2>1>30
		D3	2>1>30	1>2>30	2>1>30
		D4	2>1>30	2>30>1	2>30>1

Dónde 30 son 30 min., 1 es 1 hora y 2 son 2 horas de exposición; (>) simboliza mayor presencia de UFC/Placa, y (☉) simboliza que no se puede concluir.

Tabla 18. Influencia del tiempo de exposición en el crecimiento bacteriano-
Segundo ensayo general

Como se observa en la tabla 18, la mayoría de los datos concuerdan en que se obtiene una mayor recuperación bacteriana con un tiempo de exposición de 2 horas, y que en 30 minutos, el crecimiento es mucho menor. Obteniendo la misma tendencia que el primer ensayo general.

8.1.5. Análisis final de los ensayos generales.

Finalizados los análisis individuales de los dos ensayos realizados, se obtuvo como resultado general que se presenta mayor número de UFC/Placa, en aquellas cajas de Petri expuestas al ambiente durante dos horas y ubicadas en la posición más baja; sin embargo lo que se buscaba con esta prueba no era determinar la cantidad de microorganismos

existentes, sino buscar las condiciones óptimas para realizar un muestro de ambientes, donde se recuperen una cantidad considerable de hongos y bacterias.

Por tal motivo, se decidió que 30 minutos de exposición de la placa al aire, son adecuados para obtener una biota microbiana suficiente y así realizar posteriores análisis.

En cuanto a la altura de ubicación de las cajas de Petri, en ambos ensayos se obtuvo un mayor crecimiento en aquellas que se encontraban en el suelo, pero este resultado puede ser alterado por factores como el personal caminando cerca de las cajas y las corrientes de aire que levantan partículas ya sedimentadas y caen fácilmente en el agar, además según los resultados de una prueba de superficies que se realizó, se presenta una mayor contaminación en el piso que en los mesones, por tal motivo, se decide realizar los análisis posteriores en la altura media (M), generalmente mesones de trabajo donde el personal está expuesto al aire que circunda esta zona.

Refiriéndose al número de cajas, no se obtuvieron resultados concluyentes, que permitieran definir su cantidad, además basados en el hecho de que se realizarán análisis estrictamente cualitativos, donde solo se tendrá en cuenta el tipo de microorganismo presente en un ambiente, no es necesario hacer énfasis en esta variable. Aun así se tomó la decisión de realizar las posteriores pruebas ubicando las cajas en cinco posiciones estratégicas que incluya de alguna manera toda el área a muestrear.

8.2. Resultados y análisis de los ensayos con diferentes tipos de agar.

Posterior al tiempo de incubación requerido, se procedió a hacer un recuento de las colonias obtenidas en los cinco agares utilizados. Los resultados de ambas pruebas se muestran a continuación.

8.2.1. Resultados y análisis del ensayo con diferentes tipos de agar en un laboratorio.

Basados en las conclusiones aportadas en el numeral 8.1.5, se realizó este análisis. El recuento de las colonias obtenidas se resume en la tabla 19.

POSICIÓN AGAR	1	2	3	4	5
Ogye	1	9	3	10	8
Cetrimide	0	0	0	0	0
Plate Count	3	1	0	1	3
Baird Parker	1	0	0	0	0
EMB	0	0	1	0	0

Donde (1-5) son las posiciones de ubicación de las cajas de Petri en el laboratorio.

Tabla 19. Resultado del ensayo con diferentes tipos de agar en el laboratorio.

Como se observa en la anterior tabla, el crecimiento bacteriano fue muy reducido, a diferencia del de hongos que si presentó un mayor recuento, pero comparado con el primer ensayo general, toda la recuperación microbiana fue poca. Esto se debe a que se realizó una desinfección por aspersión en el laboratorio, reduciendo notablemente la carga microbiana presente en el aire.

8.2.2. Resultados y análisis del ensayo con diferentes tipos de agar en un baño.

Debido al poco crecimiento microbiano obtenido en la prueba anterior, se decidió realizar la prueba en este lugar. El recuento de las unidades formadoras de colonias se presenta en la tabla 20.

POSICIÓN AGAR	7
Ogye	21
Cetrimide	0
Plate Count	20
Baird Parker	15
EMB	15

Donde (7) representa el baño.

Tabla 20. Resultados del ensayo con diferentes tipos de agar en un baño.

Obtenidos los resultados, se pretendió realizar las pruebas para la identificación de algunos microorganismos como los Gram negativos recuperados en el agar EMB. Para las colonias que crecieron en el agar Baird Parker, no se realizó ningún tipo de análisis, ya que se asumía que con el reconocimiento macroscópico en el agar era suficiente para marcar como presuntivo los *Staphylococcus aureus* y con los hongos que crecieron en el agar Ogye, solo se comprobó su presencia. En la figura 29 se ilustran las 5 cajas de Petri con sus respectivas colonias, usadas para esta prueba en el baño.

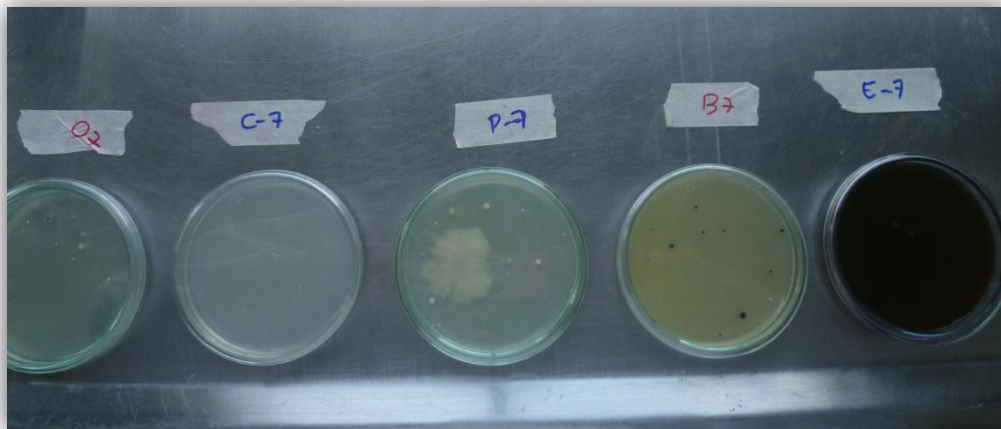


Figura 29. Crecimiento bacteriano con diferentes tipos de agar en un baño.

8.2.2.1. Pruebas realizadas a las colonias del agar EMB.

De la caja de Petri denominada E7, se tomaron 6 colonias con morfologías macroscópicas diferentes y se repicaron en agar Nutritivo, para su purificación. Luego de tener las colonias puras, se repicaron individualmente en agar EMB, para observar el crecimiento diferencial que aporta dicho agar y que presuntivamente puede ser *E.coli* ó *Citrobacter spp* por su crecimiento negro con brillo metálico verde.

No se realizó tinción de Gram, ya que los microorganismos a identificar (*E.coli*, *Salmonella spp* y *Shigella spp*) son bacilos Gram negativos y por ende no se encontrarían resultados concluyentes que permitan su identificación.

En la figura 30, se muestra uno de los repiques finales de las colonias en el agar EMB, donde se pueden observar las diferencias macroscópicas como la forma, textura y color.

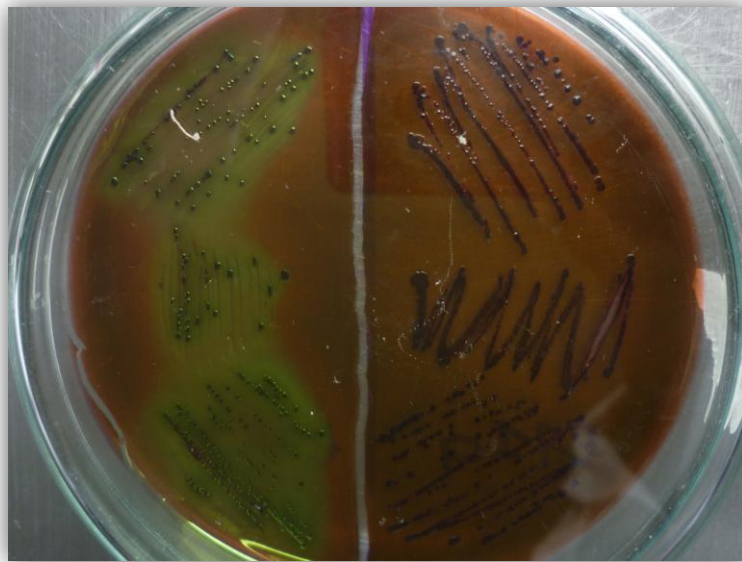


Figura 30. Repique en agar EMB.

Como se observa en la figura 30, el crecimiento bacteriano en parte izquierda de la caja de Petri, presenta la coloración y el brillo metálico característico para *E. coli* y *Citrobacter spp* mientras al lado derecho no se presenta brillo metálico.

A pesar de las descripciones de crecimiento que aporta el agar, no se puede concluir verazmente que se trata de alguno de los tres microorganismos de interés que crecen en

este medio de cultivo, y se hace necesaria una identificación plena con otro método auxiliar como son las pruebas bioquímicas.

8.2.3. Análisis final de los ensayos con diferentes tipos de agar.

Teniendo en cuenta el poco crecimiento obtenido en los medios específicos en la prueba que se realizó en el laboratorio, donde se siguieron las condiciones establecidas después de ejecutar los ensayos generales, y que en el agar Plate Count hubo un crecimiento óptimo para realizar pruebas posteriores como tinción y repiques, se decidió utilizar solo dos agares indicadores de contaminación microbiana (O y P), y no exponer los agares específicos (E,B,C) directamente al aire, sino utilizarlos para posteriores repiques.

8.3. Resultados del ensayo con dos agares para posterior repique y tinción.

8.3.1. Resultados y análisis agar Plate Count.

Luego de efectuar la prueba en el laboratorio, se llevaron a incubación las cinco cajas de Petri con agar Plate Count. Pasado el tiempo requerido, se realizó un repique de cada colonia al agar Nutritivo, y posteriormente se llevo a cabo una caracterización macroscópica de cada colonia purificada, teniendo en cuenta aspectos como forma, superficie, borde, textura y color. En la figura 31 se evidencian los repiques en realizados en (N) de todas las colonias obtenidas en (P).



Figura 31. Repiques en agar Nutritivo.

Cada caja de Petri usada en la prueba del laboratorio, se etiquetó según su posición, como ya se ha explicado anteriormente, obteniendo así cinco nomenclaturas generales: (P1, P2, P3, P4, P5), y luego de acuerdo a la cantidad de colonias obtenidas en cada una, se le adicionó otro número adelante, así por ejemplo, en la caja denominada P3, crecieron tres UFC, por lo tanto la etiqueta de cada colonia será: (P3-1, P3-2, P3-3).

En la tabla 21 se resumen las características macroscópicas de las colonias purificadas mencionadas previamente.

CAJA	FORMA	SUPERFICIE	BORDE	TEXTURA	COLOR
P 1-1	Puntiforme	Plana-convexa	Redondeado	Creмоса	Blanca
P 2-1	Irregular	Plana	Ondulado	Creмоса	Blanca
P 2-2	Puntiforme	Plana	Redondeado	Creмоса	Beige
P 3-1	Puntiforme	Plana-convexa	Redondeado	Creмоса	Naranja
P 3-2	Puntiforme	Plana-convexa	Redondeado	Creмоса	Naranja
P 3-3	Puntiforme	Plana-convexa	Redondeado	Creмоса	Naranja
P 4-1	Irregular	Plana	Ondulado	Creмоса	Blanca
P 4-3	Irregular	Plana	Ondulado	Creмоса	Beige
P 4-4	Puntiforme	Plana	Ondulado	Creмоса	Beige
P 5-1	Irregular	Plana	Lobulado	Creмоса	Beige
P 5-2	Puntiforme	Plana	Redondeado	Creмоса	Beige
P 5-3	Irregular	Plana	Ondulado	Creмоса	Beige
P 5-4	Puntiforme	Convexa	Redondeado	Dura	Blanca
P 5-5	Puntiforme	Convexa	Redondeado	Dura	Blanca

Tabla 21. Morfología macroscópica de las colonias obtenidas en Plate Count.

Luego de determinar sus características macroscópicas, se procedió a realizar la tinción de Gram con cada colonia purificada, obteniendo los datos que se presentan en la tabla 22.

CAJA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
P1-1	Cocobacilos Gram negativos
P2-1	Estreptococos Gram positivos
P2-2	Cocobacilos Gram negativos
P3-1	Cocos Gram negativos
P3-2	Cocobacilos Gram negativos
P3-3	Cocos Gram negativos
P4-1	Estreptobacilos Gram positivos
P4-2	Estreptococos Gram negativos
P4-3	Estreptobacilos Gram positivos
P4-4	Estreptococos Gram positivos
P5-1	Bacilo Gram positivo
P5-2	Cocos Gram negativos
P5-3	Estreptobacilos Gram positivos

Tabla 22. Morfología microscópica de las colonias obtenidas en Plate Count.

Estas tinciones pueden verse alteradas por factores como la calidad de los reactivos, la cantidad de inóculo que se toma, el tipo de microscopio, entre otros; y por ende arrojar resultados no confiables como algunos de los que se presentaron, por ejemplo los cocos Gram negativos son la mayoría de la familia *Neisseria spp* que causan enfermedades como la gonorrea y la meningitis, y son bacterias de difícil aislamiento que crecen en medios de cultivo muy enriquecidos y específicos para su recuperación, por lo que no sería común obtenerla directamente del aire.

Esto mismo sucede con algunos cocobacilos Gram negativos como *Brucella spp* y *Burdetella spp*, que son de difícil cultivo y no poseen las características para sobrevivir en el aire.

Aparte de las complicaciones encontradas con los resultados de la tinción, la realización del repique de cada colonia obtenida y su posterior tinción se convirtió en un ejercicio tedioso, poco práctico y no concluyente; y tampoco se contaba con los medios de cultivo específicos necesarios para la pre - identificación de los microorganismos.

8.3.2. Resultados y análisis agar Ogye.

Después del tiempo de incubación necesario para los hongos, se procedió a realizar una tinción con azul de lactofenol con el fin de observar las estructuras fúngicas características. En la figura 32 se observan dos tinciones realizadas.

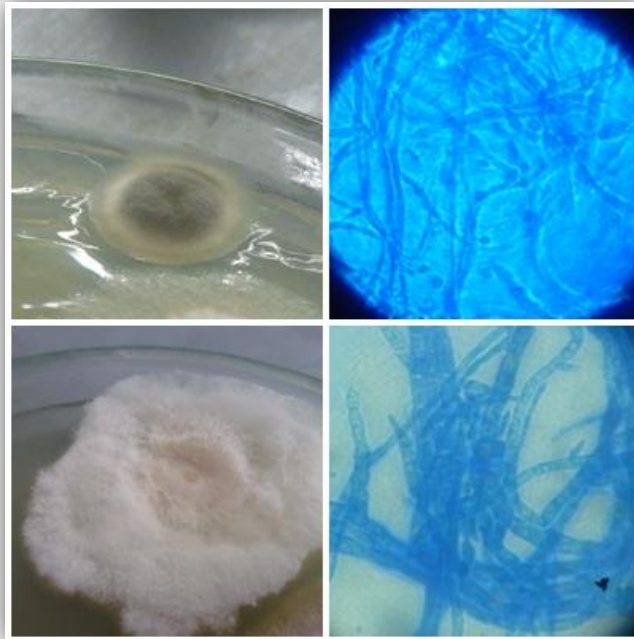


Figura 32. Tinción de hongos.

Al realizar la tinción, no fue posible lograr la identificación de las morfologías fúngicas características de determinado hongo, en parte porque las tinciones son solo una base general para observar estructuras y porque no se poseen las herramientas necesarias para la caracterización plena de estos microorganismos.

8.4. Resultados y análisis segundo ensayo con diferentes tipos de agar en un baño.

Luego de la incubación se procedió a realizar una observación minuciosa de las características de crecimiento de las colonias en los diferentes agares, ver figura 33.

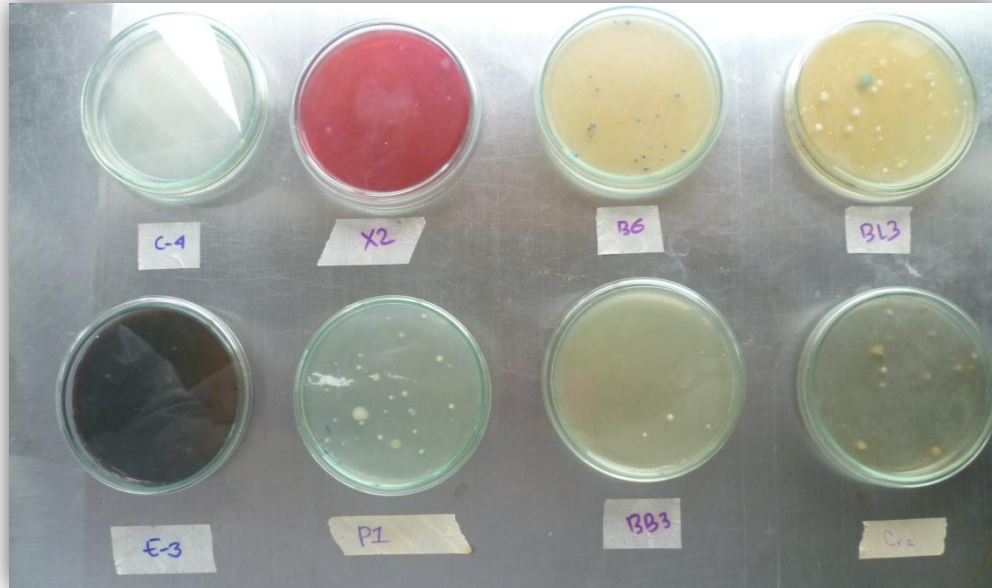


Figura 33. Crecimiento bacteriano en los diferentes tipos de agar-Segunda prueba en un baño.

En algunos de los agares, se presentó un crecimiento de colonias de los colores característicos de cada microorganismo en el medio de cultivo, por ejemplo en el agar Brilliance Listeria (BL), la *Listeria* crece de un color azul verdoso, como el obtenido en la caja de Petri denominada BL en la segunda prueba del baño (arriba a la derecha en la figura 33). Ya que este es un medio de cultivo diferencial, se debería tomar esta colonia como presuntivo para *Listeria*, sin embargo no es correcto afirmar que por las características evidenciadas en el agar se pueda identificar plenamente, sino presuntivamente, y es necesaria la implementación de pruebas bioquímicas, que aseguren la identidad del microorganismo.

Para este ensayo se pretendía utilizar un kit de identificación rápida, pero ninguno de los distribuidores ofertaba uno que incluyera todos los microorganismos con los que se pensaba trabajar, por lo que se descartaron convenientemente los agares BL, BB, X, y Cr y además estos presentaban una selectividad baja, es decir, crecía una gran biota microbiana que interfería con la pre-identificación del microorganismo deseado.

Para las colonias obtenidas en el agar EMB, el objetivo era diferenciarlas mediante dos pruebas que confirmarían o rechazarían la presencia de *E. Coli* o *Salmonella*.

Para realizar ambas pruebas, se transfirieron a agar Nutritivo, tres colonias que crecieron en el agar EMB de la prueba realizada en el baño, para luego realizar las pruebas con caldo Fluorocult e identificar *E.coli* y también realizar las pruebas para identificar *Salmonella* mediante el kit específico para Salmonella(Salmonella Test Kit),dando para ambas pruebas resultados negativos.

En ambos casos se realizó un control positivo con cepas certificadas de *E.coli* y *Salmonella monocytogenes* para verificar la confiabilidad de las pruebas. (Ver figuras 34, 35).

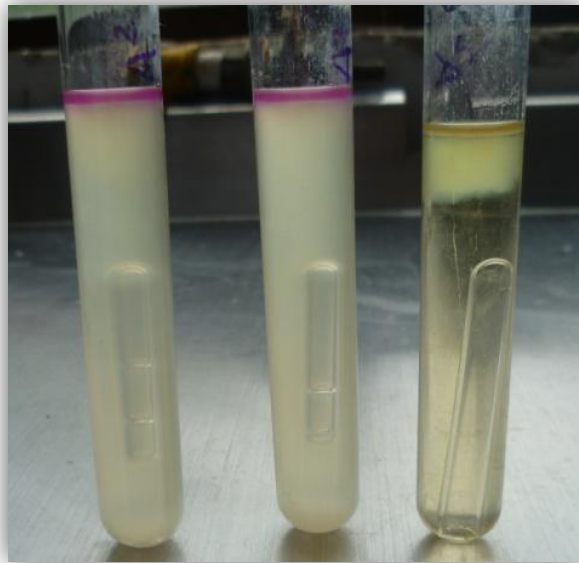


Figura 34. Control positivo y negativo para *E.coli* en caldo Fluorocult.

Los dos tubos de la izquierda corresponden a los controles positivos para *E.coli*, en los cuales se presenta turbiedad, formación de gas y el anillo rojo tras la adición del reactivo de Kovacs; el tercer tubo en la derecha es un control negativo el cual no fue inoculado.

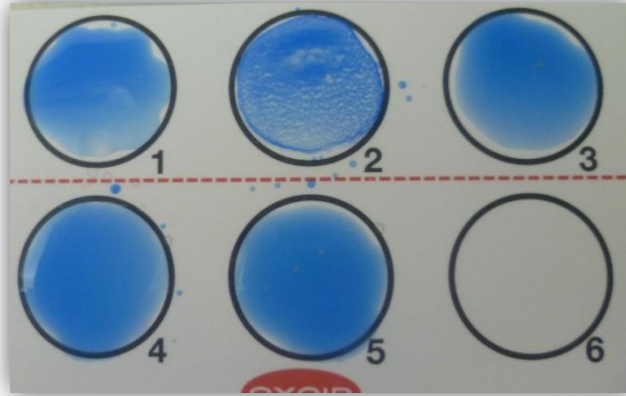


Figura 35. Prueba con el test específico para *Salmonella*.

La ubicación 1 corresponde al control negativo, el 2 corresponde al control positivo para el inóculo de *Salmonella monocytogenes*, y las ubicaciones 3, 4, 5 corresponden a las tres colonias obtenidas inicialmente en el agar EMB.

A pesar de realizar pruebas de identificación para las colonias que crecieron en el agar EMB, se obtuvieron resultados negativos para dos posibles microorganismos que crecen en este medio de cultivo, lo que indica que es necesario buscar otros métodos de identificación microbiana.

Basados en la información aportada por los proveedores, se decide utilizar el Kit microbiológico RapID ONE System, que identifica cuatro de los microorganismos de interés (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella spp.* y *Salmonella spp.*); y el Staphylasa Test que se encarga de identificar *S. aureus*. Definiendo así los cinco microorganismos a identificar en el protocolo.

8.5. Resultados y análisis de Actinomicetos.

El periodo de incubación para los Actinomicetos fue de ocho días; transcurrido se observa el crecimiento microbiano con el fin de comparar, cuál de los dos agares era más selectivo, pero desafortunadamente el crecimiento fue elevado y no presentaron la selectividad requerida, siendo casi imposible el aislamiento e identificación de alguna especie de Actinomiceto.

Para este ensayo se comparó la morfología macroscópica de las colonias obtenidas con una cepa de Actinomicetos aportada por el semillero de suelos GEA (grupo de estudio agrícola), con el fin de identificarlas, pero no se obtuvo ningún resultado concluyente.

Otro aspecto a tener en cuenta es que el agar Actinomices (AC) a pesar de ser comercial, no presenta una alta selectividad al ser expuesto al ambiente, lo que genera interferencias por la cantidad de hongos que crecen en este medio. Por otro lado, aunque el agar Avena (AV), es un medio de cultivo preparado manualmente, presentó un menor crecimiento de hongos (ver figura 36), lo que se debe a la presencia de la Nistatina, un antibiótico antifúngico; sin embargo no se pudo identificar la presencia de Actinomicetos ya que no se cuenta con un segundo método confirmativo.

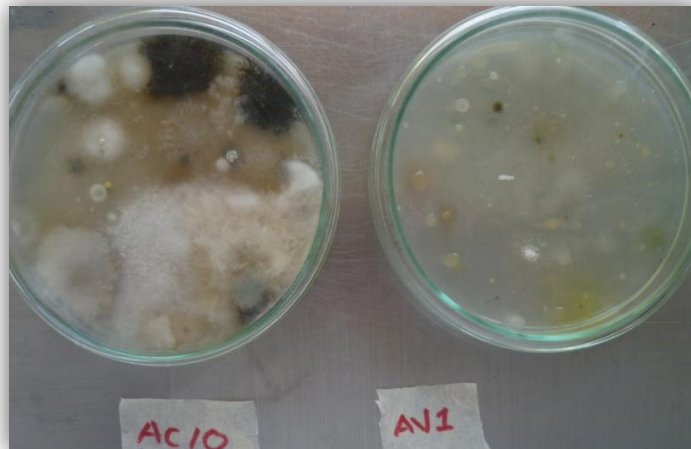


Figura 36. Crecimiento de Actinomicetos en dos diferentes agares.

8.6. Resumen final del protocolo general.

Después de realizar cada una de las pruebas anteriores, analizar cada resultado, e incluir y descartar opciones, se finaliza con un protocolo general para muestreo de ambientes siguiendo el método de sedimentación que incluye variables como tiempo de exposición, ubicación y número de cajas de Petri, todo esto enfocado en la identificación de algunos patógenos microbianos.

El protocolo general inicia con la distribución de los medios de cultivo en cinco posiciones estratégicas del lugar a muestrear; ubicándolos a una altura media, que generalmente serán mesones de trabajo; y dejando sedimentar los microorganismos sobre los agares, durante un tiempo de 30 minutos.

Los medios de cultivo que determinan los indicadores de contaminación microbiana, son el agar Ogye y el Plate Count, que junto a los medios selectivos y diferenciales, Baird Parker, Cetrimide y EMB, serán posicionados como se describió anteriormente.

Posterior a los tiempos de incubación requeridos, se realiza un repique en agar Nutritivo para purificar las colonias con morfología macroscópica diferente, obtenidas de los tres agares selectivos y diferenciales. De allí se prepara el inóculo que finalmente se identifica mediante el Kit RapID ONE System y el Staphylase Test (coagulasa).

9. ENSAYO DEL PROTOCOLO GENERAL

Teniendo como base el **PROTOCOLO DE MUESTREO MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES POR EL MÉTODO DE SEDIMENTACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Shigella spp* MEDIANTE LOS KITS MICROBIOLÓGICOS *RapID ONE* y *Staphylase test de Remel***, elaborado para el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la UTP, a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo; se procedió a probarlo en los sitios de interés mencionados en el numeral 6.9. Con el fin de identificar la necesidad de posibles variaciones.

9.1. Sector Salud

El análisis se realizó en una clínica de la ciudad de Pereira, en tres áreas: Quirófano, Sala de Recuperación y Sala de Espera, sin verse afectada la jornada laboral dentro de las instalaciones. En las figuras 37-39, se muestran algunas fotos de los lugares donde se tomaron las muestras.



Figura 37. Sala de Recuperación.



Figura 38. Quirófano.



Figura 39. Sala de Espera.

9.2. Sector Alimentos.

Este análisis se realizó en dos áreas denominadas: Cocina y Puntos de Distribución (comedores), pero esta vez, en dos establecimientos diferentes. Para las cocinas, el análisis se realizó en una sala de procesamiento de carnes, y para los comedores, se realizó en un restaurante de la ciudad de Pereira. En las figuras 40, 41, se muestran algunas fotos de los lugares donde se tomaron las muestras.



Figura 40. Sala de procesamiento de carnes.



Figura 41. Comedores.

9.3. Sector General.

Este análisis se realizó en una biblioteca de la ciudad de Pereira, con el flujo normal de personas. En la figura 42, se muestra una imagen del lugar donde se tomaron las muestras.



Figura 42. Biblioteca.

Posterior a la toma de muestras en todos los sectores definidos, no se encontró la necesidad de realizar variaciones en el protocolo general mencionado en el numeral 8.6; debido a que en todos los muestreos se obtuvo un crecimiento necesario para realizar los posteriores análisis de identificación, confirmando que las condiciones establecidas en éste son óptimas para un análisis de ambientes.

9.4. Identificación de microorganismos.

Luego de realizar los repiques y procedimientos respectivos para la utilización del Sistema Rapid ONE de Remel y del Staphylase test para *Staphylococcus aureus*, se identificaron los microorganismos que se muestran en las tablas 23-25.

SECTOR SALUD		
ÁREA	MICROORGANISMO	PROBABILIDAD* (%)
Quirófano	-	-
Sala de Recuperación	<i>Citrobacter freundii</i>	91,66
Sala de Espera	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99,9

* Esta probabilidad es la arrojada por la base de datos de Remel, suministrada con el kit de identificación

Tabla 23. Microorganismos identificados en el Sector Salud.

SECTOR ALIMENTOS		
ÁREA	MICROORGANISMO	PROBABILIDAD* (%)
Cocina	<i>Citrobacter freundii</i>	93,44
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	93,39
	<i>Moellerella wisconsensis</i>	99,9
Comedor	<i>Shiguella spp</i>	99,43
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99,9

* Esta probabilidad es la arrojada por la base de datos de Remel, suministrada con el kit de identificación

Tabla 24. Microorganismos identificados en el Sector Alimentos.

SECTOR GENERAL		
ÁREA	MICROORGANISMO	PROBABILIDAD* (%)
Biblioteca	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	93,44
	<i>Staphylococcus aureus**</i>	-

* Esta probabilidad es la arrojada por la base de datos de Remel, suministrada con el kit de identificación.

** Identificada con el Staphylase test de Remel.

Tabla 25. Microorganismos identificados en el Sector General.

Es importante aclarar que los microorganismos identificados fueron aislados de los medios de cultivo EMB y Baird Parker; en el medio Cetrimide no se presentó ningún tipo de crecimiento.

En los medios Ogye y Plate Count siempre hubo presencia de microorganismos, evidenciando contaminación microbiana en todos los lugares donde se realizaron los muestreos.

En algunos casos como en el Quirófano, los microorganismos aislados no fueron identificados por el Sistema RapID ONE de Remel, sin embargo, esto no indica que no haya bacterias suspendidas en el aire con la capacidad de crecer en un medio diferencial o selectivo.

10. CONSIDERACIONES

10.1. Estimación de costos.

Se realizó una comparación entre los costos de un análisis de ambientes por el método de sedimentación siguiendo el protocolo elaborado en el presente trabajo, donde se tiene en cuenta valores de reactivos y tiempo del analista (precio neto); y el precio actual de análisis de ambientes que se realiza normalmente en el Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, ver tabla 26.

CONCEPTO	VALOR (COP)
Análisis de ambientes siguiendo el protocolo elaborado en el presente trabajo usando los kits de identificación microbiológica.	88250
Análisis de ambientes siguiendo el protocolo elaborado en el presente trabajo sin usar los kits de identificación microbiológica.	20176
Precio actual del análisis en el laboratorio. (Mesófilos, mohos y levaduras)	25500*
*Precio bruto del análisis de ambientes en el Laboratorio de Análisis de Aguas de la Universidad Tecnológica de Pereira	

Tabla 26. Comparación de precios para análisis de ambientes por el método de sedimentación

Como se observa en la tabla 26, la diferencia entre los valores es bastante grande, lo que incitará al cliente a buscar otros laboratorios de análisis, en donde los costos sean más favorables, sin tener en cuenta que con este protocolo se logra la identificación de algunos patógenos y se están tomando muestras en diferentes puntos estratégicos del lugar a muestrear; ya que el laboratorio, actualmente, solo hace uso de una caja de Petri para dicho análisis.

Por estas razones, se hace tan importante la regulación de la cantidad y el tipo de microorganismos presentes en un ambiente en lugares en donde es de vital importancia

mantenerlo controlado, esto por parte de un ente gubernamental que esté en la capacidad de reglamentarlo.

10.2. Escala de referencia.

Con respecto a la interpretación de los resultados, se encontró en la bibliografía que no es correcto establecer un rango en donde se afirme que un ambiente está limpio o contaminado, porque el método de sedimentación es un claro método cualitativo, a lo sumo semicuantitativo y no es posible comparar resultados entre diferentes salas o con análisis que difieren en la fecha de su realización, inclusive en una misma área; por lo que no es estandarizable y las varianzas son tan altas que desvirtúan cualquier correlación, [35].

Un claro ejemplo de esto son unos valores de referencia encontrados en la Web, en donde se sugiere que un ambiente muy limpio para una sala de quirófanos de tener valores menores a 10 UFC / placa, un ambiente limpio 10 – 100 UFC/ placa y un ambiente aceptable entre 100- 200 UFC/ placa . Se cree que no es correcto emitir este tipo de resultados, puesto que se puede obtener un crecimiento, por ejemplo menor a 10 UFC/placa, pero con presencia de un patógeno peligroso, desvirtuando así el hecho de que este sea un ambiente muy limpio; reiterando nuevamente la necesidad de seguir el protocolo elaborado en el presente trabajo.

11. CONCLUSIONES

- Las variables analizadas que intervienen en un muestreo microbiológico de ambientes, por el método de sedimentación son: el número de cajas de Petri que se exponen en el lugar a analizar, el tiempo de exposición de los medios de cultivo al ambiente y la altura en la que deben ser tomadas las muestras.
- Se determinó que el tiempo óptimo de exposición de los medios de cultivo al ambiente debe ser de 30 minutos, a una altura media que en general serán los mesones de trabajo, y con un total de cinco cajas de Petri, por agar a utilizar, distribuidas estratégicamente el lugar de muestreo.
- Los medios de cultivo que se analizaron en el presente trabajo y que fueron óptimos para el crecimiento de los microorganismos de interés para el protocolo, cuya composición, características, y en algunos casos especificidad, permiten la toma de muestras por el método de sedimentación son: Ogye, Plate Count, EMB, Cetrimide y Baird Parker; complementados con kits microbiológicos que confirmen la presencia de determinado microorganismo.
- No es correcto confirmar la presencia de determinado microorganismo en un ambiente con solo observar las características macroscópicas de crecimiento en un medio de cultivo diferencial y específico; puesto que de esta manera solo se debe presumir su existencia. Para ratificar que en un ambiente se encuentra la presunta bacteria, se requiere del uso de pruebas bioquímicas o en su defecto kits de identificación microbiológica, como los usados en el presente trabajo.
- Para el correcto uso de los kits de identificación microbiológica, es necesaria la previa purificación de las colonias, en un medio de enriquecimiento como Nutritivo, puesto que los colorantes y demás suplementos de los medios selectivos y diferenciales, pueden alterar los resultados.
- No fue necesario adaptar las condiciones de muestreo generales, luego de ejecutar las pruebas en los sitios de interés; debido a que en todos los muestreos se obtuvo un crecimiento necesario para realizar los posteriores análisis de

identificación, confirmando que las condiciones establecidas en éste son óptimas para un análisis de ambientes por el método de sedimentación.

- Para poder emitir un juicio sobre la calidad microbiológica del aire, se requiere tener en cuenta el lugar de donde provienen las muestras y el riesgo que implica la presencia de determinados microorganismos, dependiendo de las actividades que allí se realicen.
- El Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira si está en la capacidad de implementar una técnica que involucre los factores que intervienen en un análisis microbiológico de ambientes y la posterior identificación de algunos microorganismos presentes en el aire.
- Con el protocolo elaborado en el presente trabajo, se concluye que no es correcto darle un enfoque cuantitativo a los resultados, ya que no se está muestreando todo el volumen del sitio a analizar, sino tomando una muestra representativa. Es por esto, que a lo largo del documento no se registran los resultados en el estándar reconocido de UFC /m³ sino en UFC/placa.

12. RECOMENDACIONES

- Si el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos decide implementar el Protocolo de Muestreo Microbiológico de Ambientes, se recomienda adquirir nuevos kits para la identificación de otro tipo de bacterias, entre ellas las Gram-positivas.
- Es recomendable realizar el muestreo del aire con las condiciones normales de funcionamiento del establecimiento, puesto que de esta manera se obtiene un resultado acorde de la carga microbiana a la que se está normalmente expuesto.
- Es pertinente ampliar la investigación con respecto a la identificación de hongos y levaduras, puesto que, como se explicó en el marco teórico, esta clase de microorganismos representan también un peligro para la salud y es preciso identificarlos para su posterior control.
- Es recomendable comparar un muestreo microbiológico de ambientes siguiendo el protocolo elaborado en el presente trabajo, con un muestreo realizado siguiendo la técnica de filtración con un muestreador automático, y así observar la cantidad de material necesario y los resultados obtenidos.
- Se recomienda que al momento de tomar las muestras, se registre la temperatura y la humedad relativa del lugar, puesto que estos factores ambientales influyen en la cantidad de microorganismos presentes en el aire, tal como se explica en el marco teórico.

13. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. García V. Introducción a la microbiología. Segunda edición. Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED). 1991.
- [2]. Pérez P.P. Hojas Informativas Ambisalud: Microbiología del aire. Ambisalud Ambientes seguros. 2010.
- [3]. Ingraham J.L; Ingraham C.A. Introducción a la Microbiología. Barcelona: Editorial Reverté S.A; 1998.
- [4]. Caorsi B; Sakurada A; Pezzani M; Latorre P. Calidad microbiológica del aire de una unidad de preparados farmacéuticos estériles. Rev Chil Infect. 2011; 28 (1): 14-18.
- [5]. Castañeda E; Rivera J.A; Lechuga K. Determinación de la calidad microbiológica del aire en una industria textil. Revista Latinoamericana de la Salud en el Trabajo. Vol.3 (2003): 21-24.
- [6]. De la Rosa M.C; Ullán C; Prieto M.P; Mosso M.A. Calidad microbiológica del aire de una zona limpia en una industria farmacéutica. Anal. Real. Acad. Farm. 2000; Vol. 66 (2): 1-17.
- [7]. Direccionamiento estratégico del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la UTP; Consultado: 4/08/2011; Disponible en la web: <http://appserver.utp.edu.co:7780/extension/faces/ext/ListadoLaboratorios.jspx;jsessionid=0a0101cd30e4874930de34c5446594439f622af688b8.e3eLbNeRahaPe34Schr0>.
- [8]. Normas aplicables y vigentes del recurso aire; Corporación Autónoma Regional del Cauca (CRC); Consultado: 11/08/2011; Disponible en la web: <http://crc.gov.co/normatividad/114.html>.
- [9]. Ray B; Bhunia A. Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. Cuarta edición. México: Mcgraw-Hill Interamericana Editores. 2010.
- [10]. Madigan M; Martinko J. Brock Biología de los Microorganismos. Duodécima edición. España: Pearson Educación. 2009.
- [11]. Sánchez L; Gómez M. Estudio Descriptivo para la Identificación de Hongos Aerotransportados y su relación con Variables Ambientales en el Sector de San Cristobal Norte. Revista El Astrolabio. Vol.8 (2009): 7-18.

- [12]. De La Rosa M.C; Mosso M.A; Ullán C. El aire: Hábitat y Medio de Transmisión de Microorganismos. Observatorio Medioambiental. Vol.5 (2002): 375-402.
- [13]. Forbes B; Sahm D. Diagnóstico Microbiológico. Duodécima edición. Argentina: Editorial Medica Panamericana. 2009.
- [14]. Roberts T; Baird Parker A; Tompkin R. Microorganismos de los Alimentos: Características de los Patógenos Microbianos. España: Editorial Acribia. 1998.
- [15]. Hawker L; Linton A; Folkes B. Elementos de Microbiología General: Introducción a la Biología de los Microorganismos. España: Editorial Acribia.
- [16]. Brooks G; Butel J; Stephen M. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Dieciochoava edición. México: Editorial el Manual Moderno. 1999.
- [17]. Maltar S; Melof A. Bacteriología Clínica: Estudio Etiológico de las Enfermedades Infecciosas de Origen Bacteriano. Colombia: Centro Editorial Javeriano CEJA. 1998.
- [18]. Tortora G; Funke B; Case C. Introducción a la Microbiología. España: Editorial Acribia. 1993.
- [19]. Arenas R. Microbiología Médica Ilustrada. Cuarta edición. México: Mcgraw-Hill Interamericana Editores. 2011.
- [20]. Malagón G; Alvarez C. Infecciones Hospitalarias. Tercera edición. Colombia: Editorial Medica Internacional. 2010.
- [21]. Quintero A; Nieto J. Infecciones en Cirugía. Colombia: Editorial Medica Internacional. 2001.
- [22]. Ponce de León S; Soto J.L. Infecciones Intrahospitalarias. México: Mcgraw-Hill Interamericana. 1996
- [23]. Mossel D.A.A; Moreno B; Struijk C.B. Microbiología de los Alimentos: Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos. Segunda edición. España: Editorial Acribia. 2006.
- [24]. Fraizer W.C. Microbiología de los alimentos. Segunda edición. España: Editorial Acribia. 1976.

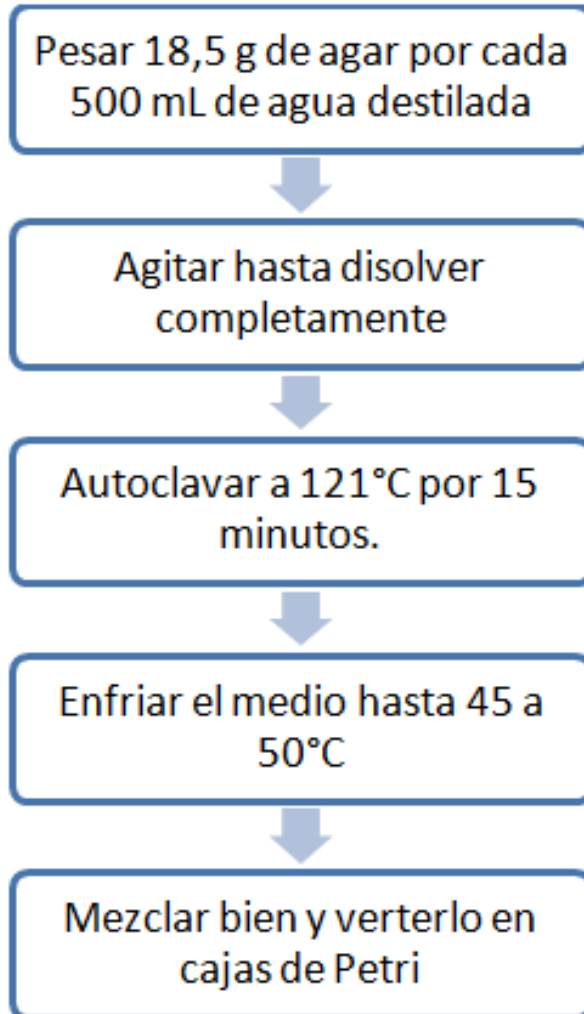
- [25]. Ortíz G; Catalán V. Calidad microbiológica en ambientes interiores. Gestión Práctica de Riesgos Laborales, número 40, pág 26, julio- agosto. 2007.
- [26]. Boldú J; Pascal I. Enfermedades relacionadas con los edificios. An. Sist. Sanit. Navar. 2005 Vol. 28, Suplemento 1. 117-121.
- [27]. Jawetz E; Melnick J.L; Adelberg E.A. Microbiología Médica. Duodécima edición. México: Editorial Manual Moderno. 1988.
- [28]. Del Valle A; Zamudio M.M. Manual de microbiología médica 9° semestre. Facultad de estudios superiores Zaragoza, España. Carrera Química Farmacéutica Biológica. 1998
- [29]. Herrera K,L. Impacto de la calidad microbiológica de aire externo en el ambiente interno en la salud del personal de cuatro laboratorios de instituciones públicas en la ciudad de Guatemala y Bárcenas Villa Nueva. Tesis de grado. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 2009.
- [30]. Montoya H. Microbiología básica para el área de la salud y afines. Segunda edición. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. 2008.
- [31]. Gilchrist L; Fuentes G; Duvieller E; *et al.* Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. Centro Internacional de mejoramiento de maíz y trigo (CIMMYT). México. 2005.
- [32]. Forsythe S.J. Alimentos seguros: microbiología. España: Editorial Acribia. 2003.
- [33]. Instructivo de uso del RapID ONE Enterobacter System de REMEL.
- [34]. Instructivo de uso del Staphylase Test Kit de Remel.
- [35]. Sanchis J. Los nueve parámetros más críticos en el muestreo biológico del aire. Revista Técnicas de LABORATORIO N° 276 (Noviembre 2002) : 858 – 862.

**PROTOCOLO DE MUESTREO
MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES
POR EL MÉTODO DE
SEDIMENTACIÓN PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE: Escherichia
coli, Pseudomonas aeruginosa,
Staphylococcus aureus,
Salmonella spp y Shigella spp
MEDIANTE LOS KITS MICROBIOLÓGICOS
*RapID ONE y Staphylase test de Remel***

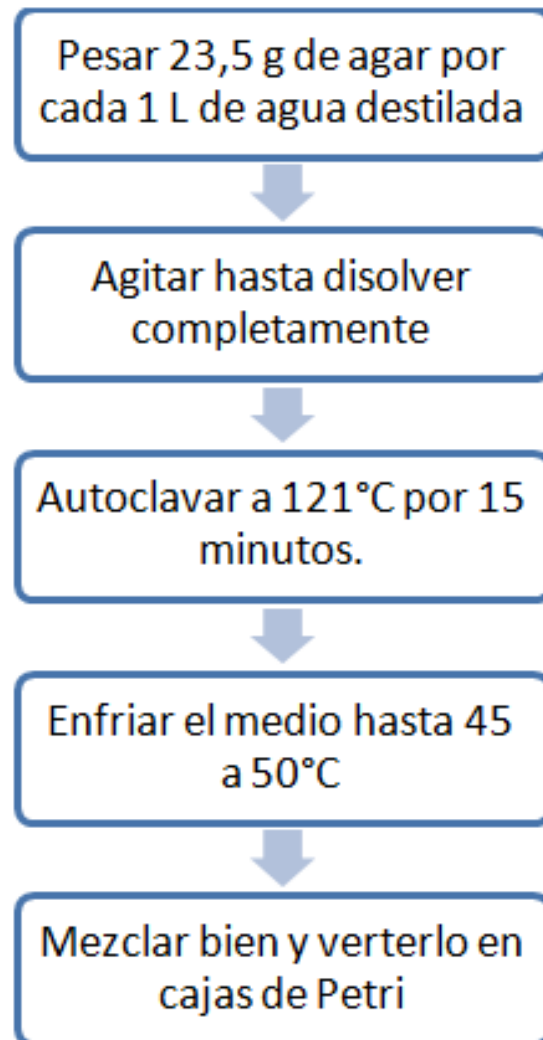
NOTA: El protocolo hace parte de los documentos controlados por el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, por lo tanto no se incluirá en este documento.

ANEXOS

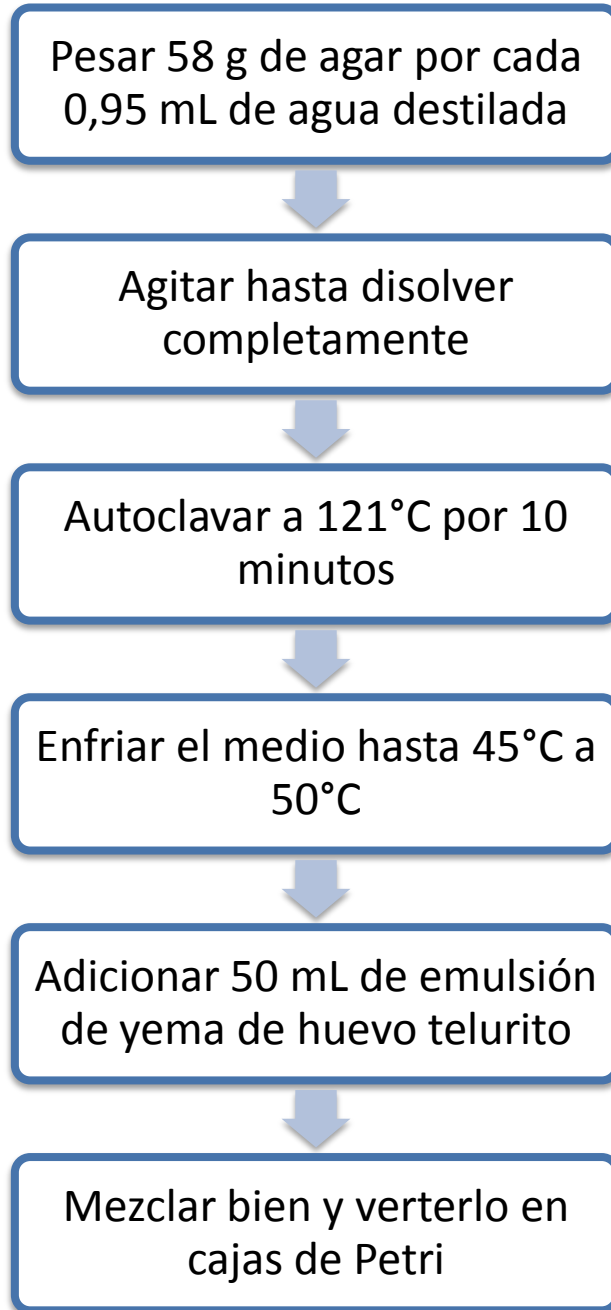
Anexo 1. Preparación del agar Ogye (O).



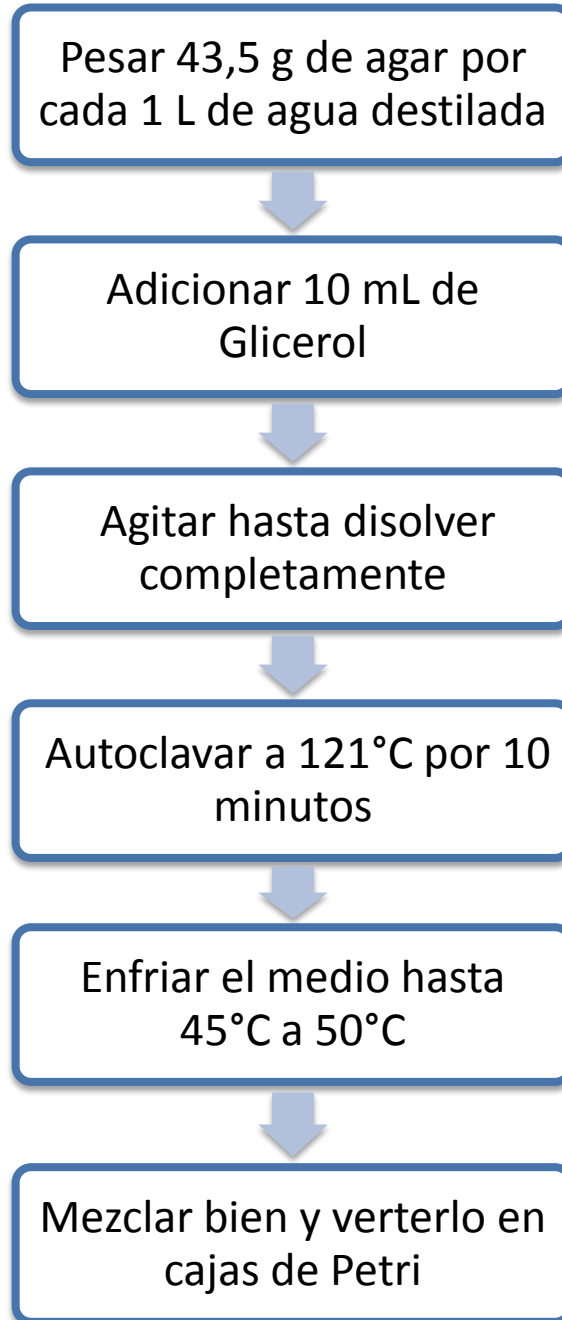
Anexo 2. Preparación del agar Plate Count (P).



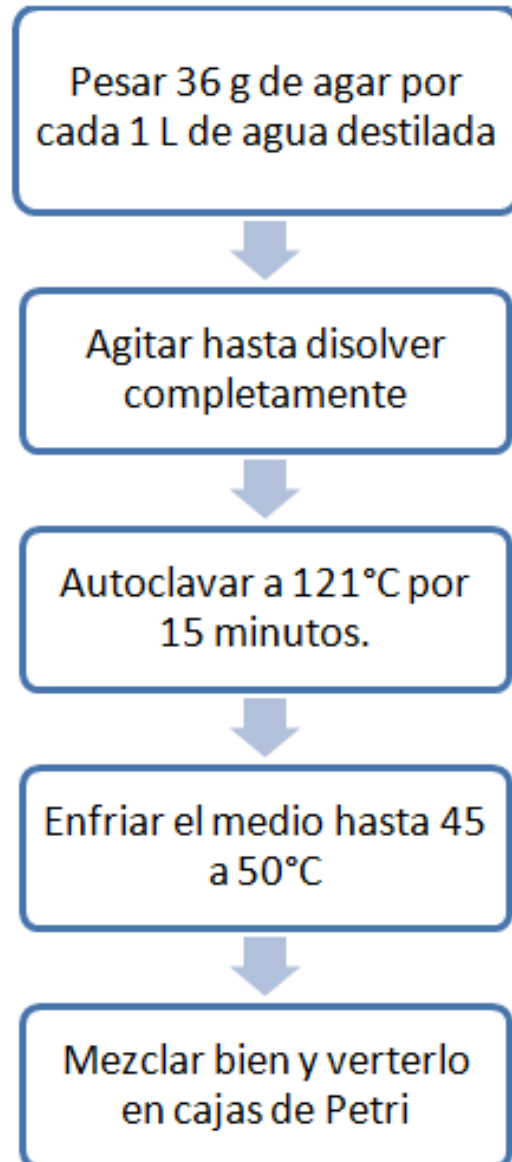
Anexo 3. Preparación de agar Baird Parker (B).



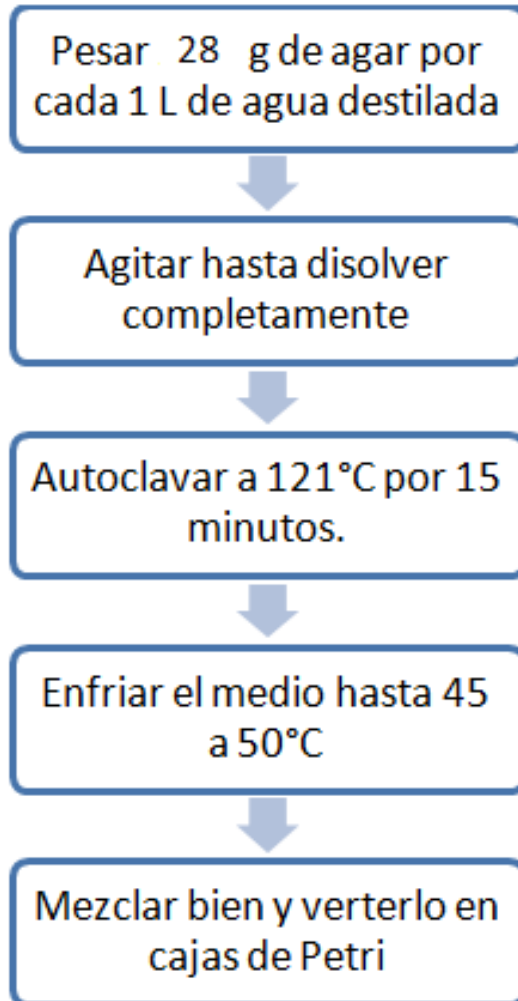
Anexo 4. Preparación de agar Cetrimide (C).



Anexo 5. Preparación de agar EMB (E).



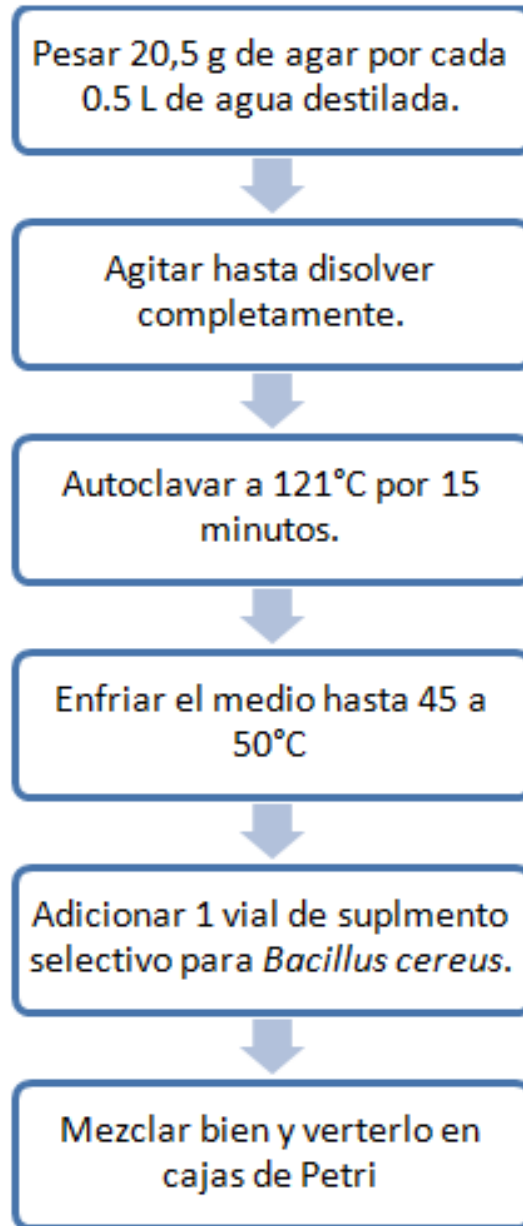
Anexo 6. Preparación de agar nutritivo (N).



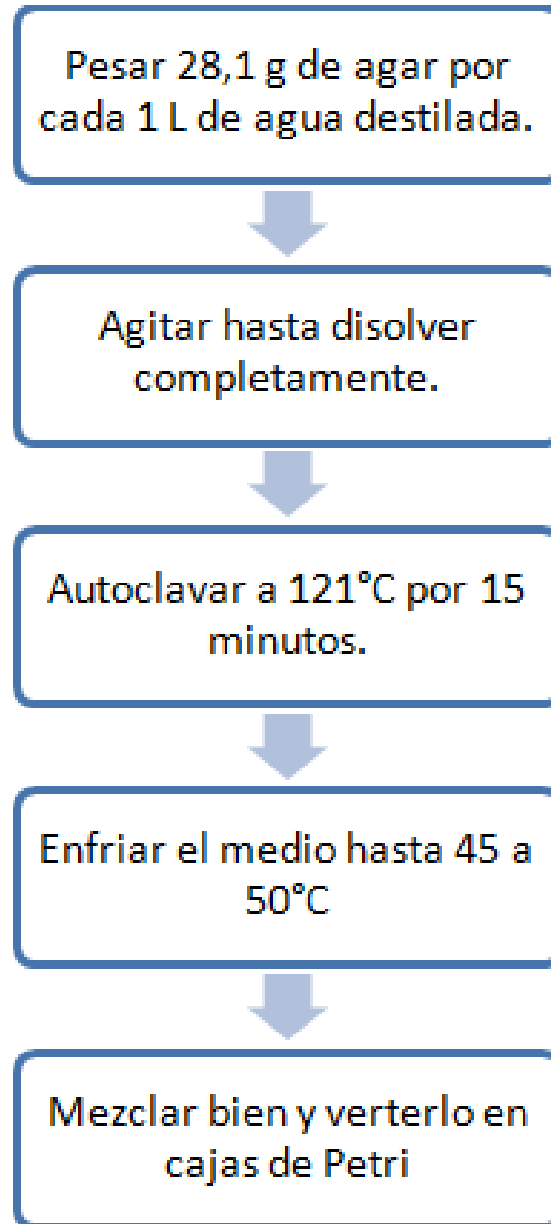
Anexo 7. Preparación de agar Brilliance Listeria (BL).



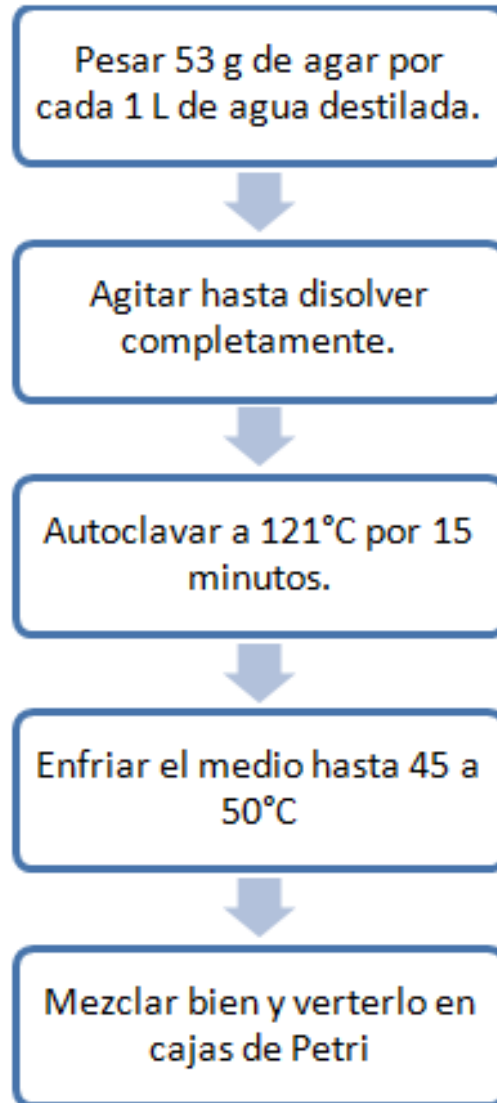
Anexo 8. Preparación de agar Brilliance *Bacillus Cereus* (BB).



Anexo 9. Preparación de agar Cromocult (Cr).



Anexo 10. Preparación de agar XLD (X).



Anexo 11. Preparación de agar Actinomices (AC).

