



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTA DE CIENCIAS FORESTALES Y CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA
MAGÍSTER EN GESTIÓN Y PLANIFICACIÓN AMBIENTAL
PROGRAMA INTERFACULTADES

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL MATERIAL PARTICULADO
ATMOSFÉRICO DE SANTIAGO MEDIANTE HERRAMIENTAS DE
BIOLOGÍA MOLECULAR**

Tesis para optar al grado de
Magister en Gestión y Planificación Ambiental

Por

Salvador Karim Barahona Crisostomo

Director de tesis: Víctor Cifuentes Guzmán.

Co-Director de tesis: Raúl Morales Segura.

Santiago, Chile.

2010



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTA DE CIENCIAS FORESTALES Y CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA

MAGÍSTER EN GESTIÓN Y PLANIFICACIÓN AMBIENTAL

PROGRAMA INTERFACULTADES

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO DE SANTIAGO MEDIANTE HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Salvador Karim Barahona Crisostomo.

Director de Tesis:
V́ctor Cifuentes Guzmán.

Co-Director de Tesis:
Raúl Morales Segura.

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Presidente:
Margarita Préndez.

Profesor informante (1)
Margarita Carú.

Profesor informante (2)
Marta Adonis.

Santiago, Chile
2010

Agradecimientos

Este es el término de una etapa en la que he crecido profesional y personalmente, esto gracias a una gran persona que me ha apoyado desde los primeros pasos en este laboratorio de enseñanzas, el Dr. Víctor Cifuentes quien ha sido y sigue siendo mi tutor no solo en lo académico sino en muchos los aspectos del diario vivir.

También quiero agradecer la oportunidad de pertenecer a este gran grupo de trabajo en el cual he conocido, aprendido, y compartido con personas de gran calidad humana.

A mi gran amiga y científica Jennifer a quien quiero muchísimo, es una hermosa persona que me ha apoyado en todo sentido.

A mi amigo y compañero de trabajo Mauricio, que es una gran persona quien me ha apoyado en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigas y amigos Natty, Pamela, Nicole, Oriana, Gabriela, Carla, Marisela, Aniela, Pilar, Dony, Iris, Marcelo, Rafael, Mario (machine), Mario (mini machine), Juan Manuel, Andrés, Vicente, Ignacio y Rubén.

Con todos ustedes he aprendido y disfrutado mucho dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Raúl Morales Co-Tutor de tesis, por su gran apoyo y conocimientos al desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Manuel Andrés Leiva del Centro Nacional de Medio Ambiente por su gran apoyo en equipamiento.

A la Dra. María Teresa Ulloa, del laboratorio de patógenos respiratorios de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por su cordial guía y ayuda en los experimentos realizados en este trabajo.

A Carabineros de Chile, especialmente al Mayor Marcelo Ávalos de la 26ª comisaria de Pudahuel y a su personal, por permitir el uso de sus dependencias y su buena disposición.

A la Dra. Margarita Préndez, Dra. Margarita Carú, Dra. Margarita Adonis, por su buena disposición y críticas constructivas en la corrección de este trabajo.

A mi Familia, Mis padres Héctor y Luisa que junto con mis hermanos Daniela, Héctor y Rocío, Marcela y Emilio, mis angelitos Francisca, Bárbara, Emilia y Martin han sido un pilar de vida.

Índice General	ii
Agradecimientos	iii
Cuadros	iv
Lista de Figuras	v
Abreviaturas	viii
Resumen	ix
1.0 Introducción	1
2.0 Marco Teórico	5
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Hipótesis	10
3.0. Materiales Y Metodos	12
3.1. Material biológico	12
Bacterias	12, 16
Enzimas	12
Ácidos nucleicos	12
3.1.1. Medios de cultivo y reactivos químicos	13
3.1.2. Sistemas de purificación y amplificación	13
Purificación de DNA Genómico	13
Purificación DNA a partir de geles de agarosa	13
Secuenciación de DNA	13
Amplificación de DNA Mediante q-PCR	13
3.2. Métodos	14
Toma de muestras de material particulado	14
Caracterización de los microorganismos cultivables	15
3.2.1. Cultivo de microorganismos	16
Muestras de contaminantes atmosféricos a partir de filtros	16
3.2.2. Purificación de ácidos nucleicos	17
DNA genómico de bacterias	17
DNA genómico de bacterias directamente a partir de filtros	17
DNA genómico de bacterias obtenido del cultivo en medio Plate-Count	17
DNA genómico de bacterias patógenas	17
3.2.3. Análisis de DNA	18

Amplificación de DNA mediante PCR.....	21
Detección de patógenos respiratorios a partir de DNA total extraído de material particulado, mediante PCR en tiempo real (Q-PCR).....	21
Extracción de DNA desde geles de agarosa.....	23
Secuenciación de los amplicones purificados de DNA desde geles de agarosa ..	24
4. Resultados	25
4.1. Toma de muestras de material particulado.....	25
4.2. Cultivo de muestras de contaminación atmosférica a partir de filtros de ésteres/celulosa.....	26
4.3. Caracterización microbiológica de las muestras de material particulado a partir de filtros de nitrocelulosa mediante secuenciación de la región rRNA. 16S.....	27
4.3.1. Extracción de DNA genómico a partir de los microorganismos aislados de las muestras de filtros de nitrocelulosa	27
4.3.2. Amplificación de la región 16S rRNA de los microorganismos aislados a partir muestras de filtros de nitrocelulosa	27
4.3.3. Purificación de los amplicones obtenidos de la región 16S rRNA a partir de DNA obtenido de las muestras de filtros de nitrocelulosa.....	30
4.3.4. Secuenciación de los amplicones de la región rRNA 16S.....	30
4.3.5 Detección de patógenos respiratorios a partir de DNA total extraído de muestras de material particulado, por medio de PCR en tiempo Real.....	34
4.3.6. Reacción de PCR anidado con PCR en Tiempo Real.....	36
5.0. Discusión.....	40
5.1. Cultivo en agar de recuento de las muestras obtenidas del material particulado.	40
5.2 Detección de patógenos respiratorios a partir de DNA total extraído de muestras de material particulado	42
6.0. Conclusión.	45
7.0 Bibliografía.....	47
Anexo1.....	54
Anexo2.....	57

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro I: Partidores diseñados a partir de regiones homólogas que codifican para las enzimas autolisina, peptidoglican asociado a una glicoproteína y una proteína de superficie potenciadora de la infectividad del macrófago, de <i>S. Pneumoniae</i> , <i>H. Influenzae</i> , <i>L. Pneumophila</i> , respectivamente	17
Cuadro II: Identificación de las especies bacterianas presentes en los filtros de nitrocelulosa obtenidos a partir del material particulado de la contaminación atmosférica de la comuna de Pudahuel, mediante la amplificación y secuenciación de la región rRNA 16S.	36
Cuadro III: Detección de <i>S. pneumoniae</i> , utilizando la reacción de PCR en tiempo real.	40
Cuadro IV: Detección de <i>L. pneumophila</i> , utilizando la reacción de PCR en tiempo real.	41
Cuadro V: Detección de <i>H. influenzae</i> , utilizando la reacción de PCR en tiempo real	42

Lista de Figuras

	página
Figura 1: Toma de muestras con impactador de cascada MOUDI	29
Figura 2: Cultivo en medio sólido Plate-Count, por diámetro aerodinámico.	30
Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa (0,7 %) de DNA Genómico.	33
Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los amplicones obtenidos a partir de la región rRNA16S.	34
Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los amplicones purificados a partir de la región rRNA16S.	36
Figura 6-A: Electroferograma obtenido a partir la secuenciación de amplicones de la región rRNA 16S.	37
Figura 6-B: Secuencia nucleotídica de <i>B. endophyticus</i> obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S.	37
Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%), ejemplo de DNA genómico obtenido a partir de filtros con material particulado.	40
Figura 8: Ubicación de los microorganismos <i>S. pneumoniae</i> y <i>L. pneumophila</i> , detectados en los periodos de muestreo, asociados a la concentración de material particulado MP ₁₀ , la temperatura, la velocidad del viento y la humedad relativa, periodo diciembre 2007- septiembre 2008.	50

Anexo1

- Figura A: Secuencia completa del gen *LytA* de *S. pneumoniae* obtenido de la base de datos del NCBI, número de acceso M13812.1. 59
- Figura B: Secuencia parcial del gen *mip* (proteína potenciadora de la inefectividad del macrófago) de *L. pneumophila* obtenido de la base de datos del NCBI, número de acceso EU047283.1. 60
- Figura C: Secuencia completa del gen *p6* de *H. Influenzae* obtenido de la base de datos del NCBI, número de acceso CP000057.2. 61

Anexo 2

- Figura A: Secuencia nucleotídica de *B. licheniformis* obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. 62
- Figura B: Secuencia nucleotídica de *B. pumilus*. Secuencia nucleotídica obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. 63
- Figura C: Secuencia nucleotídica de *B. subtilis* obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. 64
- Figura D: Secuencia nucleotídica de *B. mycooides* obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. 65

Figura E:	Secuencia nucleotídica de <i>B. megaterium</i> obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S.	66
Figura F:	Secuencia nucleotídica de <i>B. mojavensis</i> obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S.	67

Abreviaturas

EDTA	ácido etilendiaminotetracético
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
q-PCR	PCR en tiempo real
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	tampón tris-acetato-EDTA
TE	tampón tris-EDTA
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
UV	luz ultravioleta
PPDA	Plan de prevención y descontaminación atmosférica
MP	Material Particulado

Resumen

La contaminación atmosférica constituye uno de los principales problemas ambientales de Santiago. Este problema es relevante debido a su magnitud e impacto negativo generado en la salud de la población expuesta.

Este trabajo estudia la presencia de microorganismos en el material particulado atmosférico, específicamente la caracterización de la fracción cultivable de ellos y la posible presencia de bacterias patógenas respiratorias en los periodos de mayor concentración de contaminantes. Para esto se tomaron muestras de material particulado de la comuna de Pudahuel en intervalos de 7 días, mediante un impactador que fracciona en 9 rangos entre 18 μm y 0,093 μm sobre filtros de esteres/celulosa.

Con una fracción de los filtros se elaboró una metodología de detección de bacterias mediante PCR, las cuales se identificaron mediante secuenciación de la región 16S rRNA.

Para la detección de los microorganismos patógenos respiratorios, se elaboró una metodología de detección combinando las técnicas de PCR y PCR en tiempo real.

Como resultado de las metodologías desarrolladas, se detectaron especies bacterianas del genero bacillus y los patógenos *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila*.

Los resultados obtenidos entregan importantes antecedentes que refuerza la necesidad de normar el MP_{2,5}, por considerarse altamente peligrosa para la

salud de la población por su alta capacidad de penetración por su, tamaño similar al de los microorganismos detectados.

1.0 Introducción

La contaminación ambiental en la ciudad de Santiago de Chile, es un problema que se ha incrementado en los últimos años, en concordancia con la creciente tendencia del aumento poblacional y el correspondiente incremento de su radio urbano. Además, el gran desarrollo de la actividad productiva e industrial ha impactado fuertemente las variables físicas y biológicas del medio ambiente urbano. Es así que, la contaminación atmosférica emerge como uno de los problemas ambientales más relevantes por sus efectos negativos en la calidad de vida de las personas, afectando la salud y el bienestar general de la población expuesta (Carrasco y Richard, 2006; Morales, 2006; Dales y Vidal, 2010; Sanhueza y cols., 2009; Dales y cols., 2009; Cifuentes y cols., 2000; Adonis y Gil, 2000).

Las investigaciones relacionadas con la contaminación atmosférica invernal y su impacto en la salud de la población han sido orientadas principalmente a la caracterización del material particulado (MP) orgánico e inorgánico, tanto primario como secundario. Ello ha dado lugar a medidas para su disminución a través del plan de prevención y descontaminación de Santiago (PPDA) (Morales, 2006; CONAMA, 1997). En la actualidad, se cuenta con una amplia literatura sobre los efectos que ejerce el material particulado en el organismo humano y sobre la variación de los niveles de contaminación en los distintos períodos estacionales del año en la ciudad de Santiago. Este fenómeno ha estado estrechamente relacionado con el aumento de las consultas médicas por enfermedades respiratorias (Brunekreef y Forsberg, 2005; Morales, 2006; Prieto y cols., 2007;

Cifuentes y cols., 2000), aun cuando no se han realizado evaluaciones sistemáticas para este efecto.

En 1996, la región metropolitana fue declarada zona saturada por partículas totales en suspensión (PTS), material particulado menor a 10 micrones (MP_{10}), monóxido de carbono (CO) y ozono troposférico (O_3) y como zona latente por óxido de nitrógeno (NO_x) (Decreto Supremo N° 131, Ministerio Secretaría General de la Presidencia).

La normativa vigente no define los niveles de preemergencia o emergencia en al caso de O_3 , y de partículas totales en suspensión (PTS), por lo tanto, los criterios para decretar episodios críticos de contaminación están referidos solo al material particulado respirable.

Históricamente los episodios críticos de contaminación se han dado por el material particulado inhalable MP_{10} en periodos invernales, en tanto que en periodos primavera verano la contaminación está dada principalmente por ozono (Morales, 2006; CONAMA, artículo 1193).

La norma de calidad de aire establece como bueno una concentración de $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{10} mediante el índice de Calidad del Aire por Material Particulado (ICAP). Este es una simplificación que lleva a una escala estándar el valor promedio de las concentraciones del MP_{10} , de acuerdo a lo que establece la norma para este contaminante.

El decreto supremo N° 32 de 1990 y la Resolución N° 369 de 1988, establecen como alerta la superación del nivel $195 \mu\text{g}/\text{m}^3$, preemergencia la

superación del nivel 240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, crítico el nivel 285 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, peligroso, emergencia la superación del nivel 330 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, según el índice ICAP (D.S 32).

En la región metropolitana, se ha observado una conjunción de factores que inciden en el incremento de enfermedades respiratorias, donde a la contaminación atmosférica se suma la acción de microorganismos tales como virus y bacterias, dentro de las que se encuentra la neumonía adquirida en comunidad (NAC) (Cañete, 1999; Álvarez, 2003).

En Chile, NAC es la tercera causa de muerte en la población de niños y adultos mayores, siendo la bacteria *Streptococcus pneumoniae* el principal agente etiológico, seguido en menor grado por las bacterias *Haemophilus influenzae* y *Legionella pneumophila* (Aliste, 2007; Arancibia y Díaz, 2005).

S. pneumoniae es un estreptococo gram positivo de forma oval que suele agruparse en forma de parejas (diplococos) o en cadenas cortas. Es un microorganismo aerobio y anaerobio facultativo, inmóvil, que no forma esporas y que se transmite desde una persona portadora o infectada a otras susceptibles, por contacto estrecho. Se diferencia de otras especies de estreptococos, debido a que, en presencia de bilis o sales biliares, esta bacteria se autolisa por acción de la enzima autolisina, producto del gen *lytA*. Esta característica fenotípica se ha utilizado como base para su identificación, a través de su genotipificación por la presencia del gen *lytA* (Puigdueta y Fernandez, 1998; Prado, 2001; Parra y cols., 2007; Messmer y cols., 1997).

Por otra parte, *H. influenzae* es un bacilo o cocobacilo gram negativo, cuyo reservorio natural es el tracto respiratorio superior humano. Su detección

genotípica se realiza por medio de la amplificación del gen *p6* cuyo producto codifica una proteína de membrana externa (Deich y cols., 1998; García y cols., 2008; Martínez, 2005).

Finalmente, *L. pneumophila* es un microorganismo gram negativo que puede presentar formas de cocos o cocobacilos. Esta es una bacteria ambiental cuyo hábitat natural o reservorio primario, son las aguas superficiales como lagos y ríos. Se encuentra en forma planctónica en bajas concentraciones, al interior de protozoos o formando parte de un “biofilm” (Fliermanns y cols., 1981; Atlas, 1999). La transmisión al hombre de *L. pneumophila* está asociada a diversos sistemas que utilizan agua y que son capaces de producir aerosoles. (Romeu y cols., 2003). Su detección genotípica se realiza por medio de la amplificación del gen *mip* que codifica una proteína potenciadora de la infectividad en el macrófago (Cianciotto y cols., 1989). Sin embargo, los estudios científicos de la contaminación no han relacionado ni descartado la presencia de los componentes bióticos, específicamente microorganismos, en el material particulado, con el aumento consecuente de las enfermedades respiratorias. Tomando en cuenta que el material particulado tiene rangos de tamaño en la fracción respirable, sería posible que retuviera microorganismos de un tamaño más pequeño a 10 micrometros.

Este trabajo tiene como objetivo principal determinar la presencia y caracterizar los componentes microbiológicos asociados al material particulado aéreo y su relación con enfermedades respiratorias que se presentan en los períodos invernales, cuando aumenta la concentración de contaminantes atmosféricos y con ello, contribuir al desarrollo de estrategias para implementar programas de descontaminación y prevención en la ciudad de Santiago.

2.0 Marco Teórico

“La contaminación atmosférica constituye uno de los principales problemas ambientales de Santiago: la atmósfera de esta ciudad se presenta como un ininteligible y complejo reactor químico, en donde tienen lugar múltiples reacciones, tanto a nivel de especies orgánicas como inorgánicas, ya sea en fases líquidas o sólidas, definiendo en su conjunto lo que hoy se conoce como “Química Atmosférica Urbana” (Morales, 2006).

Desde hace algunas décadas se han venido produciendo altos niveles de contaminación, tanto de gases como de partículas que han afectado la salud de la población. Tradicionalmente, los estudios de los efectos de las partículas atmosféricas (MP) sobre la salud se han enfocado al material particulado $< 10 \mu\text{m}$ (MP_{10}) y $< 2,5 \mu\text{m}$ ($\text{MP}_{2,5}$) de diámetro. Recientemente, sólo se ha estudiado la fracción de mayor diámetro de las MP_{10} , macropartículas $> 2,5 \mu\text{m}$. Comparadas con las $\text{MP}_{2,5}$, estas partículas se caracterizan por tener diferentes orígenes y composición (Casas y cols., 2004; Brunekreef y Forsberg, 2005).

La composición química orgánica del material particulado atmosférico de Santiago ha sido estudiada por varios autores (Gil y cols., 2000; Romero y cols., 2002; Romokroger, 1990; Sienna y cols., 2002.).

Se observó que en la fracción gruesa predominaba la participación de polvo del suelo, acompañada de contribuciones de procesos industriales y de combustión. En la fracción fina predominan los efectos de los procesos de combustión. Un 60% de este proviene de componentes inorgánicos formados por aerosoles secundarios como amonio (8-17%), nitrato (15-28%) y cloruro (2-5%), en tanto, el carbono orgánico y elemental se eleva al 15 a 20%.

Por otra parte, el sistema respiratorio constituye una puerta de entrada de los contaminantes aéreos, por lo tanto es en este sistema donde los contaminantes tienen su primera oportunidad de ejercer sus efectos nocivos (Morales, 2006).

Se han relacionado los períodos de contaminación atmosférica con el aumento en las consultas por Enfermedades Respiratorias Agudas (IRA) tales como faringitis, amigdalitis, resfríos, síndrome bronquial obstructivo, alergias y asma.

Dentro de los microorganismos asociados a estas enfermedades se encuentran *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, Virus influenza A y B (Saldias y Pavie, 2005; Jimenez y Calvo, 2005). Las bacterias tienen un tamaño entre 0,4 y 14 μm y sobre 0,2 a 12 μm de ancho y los virus tienen un tamaño entre 0,02 y 0,009 μm (Atlas y Bartha, 2002).

La mayoría de los estudios de contaminación atmosférica están enfocados a las partículas y su caracterización física y química. Existen pocas referencias de estudios sobre material biótico, específicamente microbiológico, presente en componentes atmosféricos sólidos, líquidos y éstos son poco concluyentes. Si bien no existen antecedentes que afirmen que dentro de estas componentes existen microorganismos asociados a las enfermedades respiratorias, tampoco existen estudios que lo nieguen. Considerando que los contaminantes atmosféricos de la fase respirable son de tamaño entre MP_{10} y $\text{MP}_{2,5}$ y que corresponde al rango de tamaño microbiano, entonces existiría la posibilidad que se puedan encontrar diversos microorganismos asociados a la

microbiota; esta podría, a su vez, estar relacionada a enfermedades respiratorias ya sea por su agente causal o favorecer la infectividad del patógeno actuando en conjunto.

Aunque la atmósfera resulte un medio hostil para los microorganismos, existe un número significativo en la troposfera inferior y el movimiento del aire es el principal agente de dispersión de éstos. Algunos se han adaptado para favorecer su supervivencia y dispersión en la atmósfera, pero lo más común es encontrarlos en forma de esporas. Las esporas presentan propiedades que contribuyen a la capacidad de resistir en condiciones de desecación y diferentes temperaturas. Por su baja actividad metabólica no necesitan nutrientes (Atlas y Bartha, 2002; Oliveira y cols., 2005).

La abundancia de los microorganismos dispersos en el aire puede deberse a diversos factores como circulación turbulenta, vehículos, viento, temperatura, disponibilidad de agua, cantidad de polvo suspendido, etc. Cabe destacar que los agentes contaminantes atmosféricos (NO, CO, hidrocarburos) pueden tener un efecto protector para los microorganismos, dependiendo de la especie (Chandra y cols., 2005; Lin y Li, 2000; Jones y Harrison, 2003; De la Rosa y cols., 2002).

El tiempo que permanecen los microorganismos en el aire depende de la forma, tamaño, peso y de la existencia y potencia de las corrientes aéreas que los sostengan y los eleven. (De la Rosa y cols., 2002).

La inhalación continua de partículas contaminantes, incrementa la susceptibilidad a las infecciones respiratorias principalmente en las ciudades

contaminadas con derivados de hidrocarburos los que aumentan los niveles de gravedad de las infecciones respiratorias (De la Rosa y cols., 2002).

Hay numerosas enfermedades bacterianas transmitidas por el aire, producidas principalmente por bacterias Gram positivas, las cuales afectan al tracto respiratorio superior (faringitis, epiglotitis, difteria) e inferior (bronquitis, neumonías, tosferina, tuberculosis) (Jensen, 1997).

A la fecha, son poco conocidos los efectos de la contaminación ambiental a largo plazo, tanto a nivel respiratorio como a nivel sistémico y celular, por lo que sería necesario desarrollar protocolos prospectivos de la correlación entre la contaminación ambiental y la patología respiratoria (Terrés y cols., 1996) Los alcances de este proyecto están orientados a establecer la presencia de microorganismos en el material particulado de la contaminación atmosférica y si es que en este existen microorganismos relacionados a enfermedades respiratorias en los periodos de mayor concentración de contaminantes, los cuales tienen incidencia con el aumento de este tipo de enfermedades.

No se establecerá la patogenicidad de los microorganismos o la viabilidad de éstos, ya que se considera imprescindible primero establecer la presencia de estos, lo que podría dar paso al desarrollo del estudio de la patogenicidad y viabilidad de éstos.

Para la caracterización y detección de microorganismos se aplicarán técnicas de microbiología clásica, considerando que solo el 1% de las bacterias que se encuentran en el medio ambiente son cultivables (Handelsman, 2004, Amann y cols., 1995), se utilizarán además técnicas de moleculares para la

detección específica de microorganismos patógenos para el ser humano y que estén relacionados con enfermedades respiratorias.

Hipótesis

Si el material particulado que forma parte de la contaminación atmosférica urbana invernal de la ciudad de Santiago está constituido por materiales inorgánicos, orgánicos, así como por especies y fracciones de material biológico, entonces, deberá ser posible identificar en la Subfracción biológica del material particulado especies tales como bacterias, hongos y esporas, entre ellas bacterias con incidencia en las enfermedades respiratorias en períodos invernales de la ciudad de Santiago.

Objetivo general

Estudiar el componente microbiológico presente en el material particulado atmosférico de Santiago e identificar la presencia de bacterias asociadas a enfermedades respiratorias que surgen en períodos invernales de alta contaminación.

Objetivos específicos

Determinar la presencia de material microbiológico, en el material particulado atmosférico de Santiago.

Caracterizar los componentes microbiológicos presentes en el material particulado atmosférico de Santiago, en microorganismos ambientales, patógenos y oportunistas.

Identificar bacterias asociadas a enfermedades respiratorias, propias de períodos invernales en la ciudad de Santiago o su correspondiente material genético.

3.0. Materiales y Metodos

Materiales

3.1. Material biológico

Bacterias

Se utilizaron como controles las cepas de aislados clínicos de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, proporcionadas por la profesora María Teresa Ulloa, del Laboratorio de Patógenos Respiratorios, Programa de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Enzimas

La enzima *Taq* DNA polimerasa, se adquirió de compañías como Promega, BioLabs y Gibco-BRL, USA.

La enzima lisozima, se adquirió en Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A.

Ácidos nucleicos

Los marcadores de tamaño molecular, DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa *Hind* III, y “DNA Gene Ruler 100 pb ladder” se adquirieron de BioLabs Inc. U.S.A y Fermentas Life Science Canada, respectivamente.

3.1.1. Medios de cultivo y reactivos químicos

Todos los productos químicos utilizados son de uso general y frecuente en un laboratorio de microbiología y fueron adquiridos de compañías como Merck Química Chilena Soc. Ltda., Sigma Chemical Co. ST. Louis, Missouri, U.S.A., Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A, Biomerieux Chile S.A.

3.1.2. Sistemas de purificación y amplificación

Purificación de DNA Genómico

Para la purificación de DNA genómico se utilizó el kit “MagaZorb DNA Miniprep kit I”, de Promega.

Purificación DNA a partir de geles de agarosa

Para la purificación de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System”, Promega.

Amplificación de DNA Mediante q-PCR

Para la amplificación de DNA mediante q-PCR se utilizó el termociclador Mx3000P stratagene, con el kit “SensiMix Plus SYBR”, Quantace.

Secuenciación de DNA

Para la secuenciación de DNA, se utilizó el secuenciador automático 3100-Avant Genetic Analyzer, con el kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit”, ambos de la empresa Applied Biosystems.

3.2. Métodos

Toma de muestras de material particulado

La toma de muestra se realizará con un impactador MOUDI tipo cascada, equipo que permite separar las diferentes partículas de acuerdo a los siguientes diámetros aerodinámico: 18, 3,2, 1,8, 1,0, 0,56, 0,33, 0,175 μm y “after filter” el cual colecta tamaños de partículas menor a 0,093 μm , siendo colectado cada uno en filtros de nitrocelulosa los cuales son utilizados para muestras biológicas. Su principio de operación es pasar aire a través de una serie de etapas donde las partículas aceleradas impactan sobre platos sucesivos de recolección, lo que permite un mayor tiempo de muestreo sin la saturación del filtro, a diferencia de otros equipos en la cual el aire es filtrado saturando rápidamente el filtro, por lo que la cantidad de muestra es menor en comparación por impactación.

La campaña de muestreo se realizará en la comuna de Pudahuel, comuna seleccionada por presentar altos índices de contaminación durante los periodos invernales (Morales, 2006). El equipo fue ubicado específicamente en la 26ª comisaria de Pudahuel (Latitud: 36° 26'54.28"S; Longitud: 70° 14'23.29"O).

Las muestras se recolectarán entre diciembre del 2007 y septiembre del 2008, con un tiempo de muestreo de 7 días, en situaciones de alta concentración de contaminación, como los periodos de preemergencia y emergencia, referidos a periodos de buena calidad de aire, junto con emplear un área de referencia que no presente problemas de contaminación por material particulado, preferentemente fuera de la ciudad de Santiago, en la localidad del

Monte, provincia de Talagante (Latitud: 33° 42'13.26"S; Longitud: 70° 55'27.03"O) y la estación ecológica ubicada en el lago Rapel, provincia de las Cabras, perteneciente a la Universidad de Chile (Latitud 34°S, 71°W), Como medida de control de manipulación se agregó un control de transporte, en el cual un filtro es expuesto al realizar el montaje de los filtros para el muestreo y la extracción de estos.

Caracterización de los microorganismos cultivables.

Para esto se amplificará y secuenciará el gen del rRNA 16S, el cual es utilizado frecuentemente como marcador genético, ya que se encuentra en casi todas las bacterias cumpliendo una misma función y no ha cambiado mayormente en el tiempo. Atendiendo a que a partir de la implementación de la técnica secuenciación del amplicon del rRNA 16S se ha observado un incremento sostenido en la identificación de nuevas especies bacterianas (Janda y Abbott, 2007), su uso se ha hecho masivo facilitando enormemente la caracterización de los microorganismos. Por estas razones, en este trabajo se ha utilizado esta moderna y eficiente tecnología. Además, el alto grado de conservación de esta región ha permitido el diseño y validación de partidores universales (Weisburg y cols., 1991).

3.2.1. Cultivo de microorganismos

Bacterias

Para el cultivo de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) se utilizó agar TSA (peptona de caseína 1,7 %, peptona de soya 0,3 %, D (+) glucosa 0,25 %, cloruro de sodio 0,5 %, dipotasio de hidrogenofosfato 0,25 %,) con 5 % de sangre de cordero.

Para el caso de *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) se utilizó agar chocolate (peptona de caseína 1,7 %, peptona de soya 0,3 %, D(+) glucosa 0,25 %, cloruro de sodio 0,5 % ,dipotasio de hidrogenofosfato 0,25 %,) con 5 % de sangre de cordero calentada a 56 °C mas 1 % de Polyvitex.

Las bacterias se incubaron en una atmósfera con CO₂ al 5 % y a una temperatura de 37 °C por 16 h.

En el caso de *Legionella pneumophila*, se cultivó en agar carbón activado 0,2 %, extracto de levadura 1 % a 37 °C, por un período de tiempo entre 48 y 72 h.

Muestras de contaminantes atmosféricos a partir de filtros

Para el cultivo de microorganismos obtenidos de las muestras de contaminantes atmosféricos de cada tamaño de partícula, se cortó con un bisturí, una zona de 5 mm del filtro que contenía el material particulado y se depositaron individualmente en tubos Eppendorf de 1,5 ml. A cada tubo, se le agregaron 120

µl de agua bidestilada estéril y se homogenizó en un agitador por 10 min. El volumen total se sembró en Agar Plate-Count (Merck Química Chilena Soc. Ltda.), incubándose por 16 h a 37 °C.

3.2.2. Purificación de ácidos nucleicos.

DNA genómico de bacterias

DNA genómico de bacterias obtenido del cultivo en medio Plate-Count.

A partir de los microorganismos presentes en el material particulado que crecieron en el medio de recuento total, se agruparon en placas con el mismo medio de cultivo y se seleccionaron aquéllos que presentaban una morfología diferente en las distintas muestras. Los microorganismos seleccionados fueron crecidos en medio líquido “Plate-Count” durante 16 h a 37 °C, para posteriormente extraer su DNA.

DNA genómico de bacterias patógenas.

El DNA de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *L. pneumophila*, se purificó utilizando el kit “MagaZorb DNA Miniprep kit I” (Promega). Este DNA fue analizado por electroforesis en geles de agarosa (0,7 %) en tampón TAE 1X, ph:8.0 y en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml.

DNA genómico de bacterias directamente a partir de filtros

El DNA del total de bacterias fue obtenido a partir de ¼ de los filtros de muestreo de diámetros aerodinámicos de 18, 3,2, 1,8, 1,0 y 0,50 µm por medio

del “Kit MagaZorb DNA Miniprep kit I”. Las muestras de cada filtro fueron fragmentadas utilizando una tijera previamente esterilizada; se les agregó 100 μ l de perlas de vidrio de 0,5 mm y 300 μ l de Tris-EDTA-lisozima (10 mM, 1 mM y 40 μ g/ml, respectivamente). Luego se agitó por 10 min, se centrifugó por 10 min. y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se prosiguió con la extracción de DNA genómico de acuerdo a las instrucciones de los proveedores del kit, resuspendiendo finalmente el DNA en 120 μ l de tampón de elución Tris-EDTA (10mM: 1mM, pH 8,0). El DNA fue analizado por electroforesis en geles de agarosa (0,7 %) en tampón TAE 1X, pH: 8,0 y en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 μ g/ml.

3.2.3. Análisis de DNA

Diseño de partidores

Se diseñaron partidores específicos directo y reverso para la amplificación del DNA de regiones específicas de *Streptococcus pneumoniae* (Parra y cols., 2007; Messmer y cols., 1997) *Haemophilus influenzae* (Parra y cols., 2007; Deich y cols., 1998) *Legionella pneumophila* (Cianciotto y cols., 1989) a partir de regiones homólogas de los genes los cuales son *lytA* que codifica la enzima autolisina, *p6* que codifica una proteína de membrana externa y el gen *mip* que codifica una proteína de superficie potenciadora de la inefectividad del macrófago, respectivamente (Tabla I). Para el diseño de los partidores se utilizó el software AmplifX v1.4 de la empresa Stratagene, utilizando las secuencias nucleotídicas obtenidas del Genebank del NCBI para el gen *lytA* de *Streptococcus pneumoniae*

(N° de acceso M13812.1); para el gen *p6* de *Haemophilus influenzae* (N° de acceso CP000057.2); para el gen *mip* de *Legionella pneumophila* (N° de acceso EU047283.1) (anexo 1, figura A, B C). Los partidores se probaron en reacciones de PCR utilizando DNA de cada microorganismo como molde para confirmar su especificidad.

Cuadro I

Partidor	Orientación	Secuencia nucleotídica	Tamaño esperado del producto
Real_LytA_Outer	Directo	tggcaaacctgctcatct	
Real_LytA_Outer	Reverso	acgcacactcaactgggaat	255 pb
Real_LytA_Inner	Directo	ttcaaccgctgcataggtct	
Real_LytA_Inner	Reverso	actgggaatccgcattcaac	180 pb
Real_legionella pneumophilla_Outer	Directo	aggcatgcaagacgcatga	
Real_legionella pneumophilla_Outer	Reverso	aacgttgctggcttaccagt	339 pb
Real_legionella pneumophilla_Inner	Directo	gtggcgctcaattggcttta	
Real_legionella pneumophilla_Inner	Reverso	cgaccagtgtattcgacagt	262 pb
Real_Haemophilus influenzae_Outer	Directo	acgttggcctaatacgcatgt	
Real_Haemophilus influenzae_Outer	Reverso	gcaggttctgtagctgcatt	282 pb
Real_Haemophilus influenzae_Inner	Directo	tctggtgtaccacgttcac	
Real_Haemophilus influenzae_Inner	Reverso	ttggcggttactctgttgc	182 pb

Partidores diseñados a partir de regiones homólogas de los genes: *lytA* de *S. Pneumoniae*, *p6* de *H. Influenzae*, y *mip* de *L. Pneumophila*.

Amplificación de DNA mediante PCR

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μ l que contenía tampón de PCR 1 X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxibonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ M de cada partidor Outer, 5 μ l de la muestra de DNA molde obtenido a partir de los filtros y 2,5 unidades de *Taq* polimerasa. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystem 2720 utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación de los partidores a 55 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 3 min. Luego se dejó 10 minutos a 72 °C para una elongación final y finalmente mantenida a 4 °C.

Detección de patógenos respiratorios a partir de DNA total extraído de material particulado, mediante PCR en tiempo real (Q-PCR)

Para la detección de los patógenos humanos respiratorios, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *L. pneumophila* mediante PCR, se utilizó como molde el DNA genómico total obtenido a partir de los filtros con material particulado y partidores específicos para cada microorganismo.

Con el fin de obtener una mayor sensibilidad en la detección, se combinaron dos técnicas de PCR. Inicialmente se amplificó el DNA genómico mediante la técnica de PCR estándar. Posteriormente los productos obtenidos se precipitaron y concentraron con el fin de ser utilizados como material genético para una nueva reacción de PCR en tiempo real. Esta técnica, por sus

características de alta sensibilidad, permite detectar hasta 10 copias de DNA blanco. Los resultados se analizaron de acuerdo al valor de Ct (Umbral del ciclo o comienzo del ciclo) obtenido a partir de las curvas de amplificación de qPCR. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de DNA de doble hebra presente en la muestra y es asignado al comienzo de la fase exponencial de la curva.

El valor Ct se calcula automáticamente por el software MxPro, versión 3.20 (stratagene), homogenizando el análisis y evitando errores por cálculos manuales; de esta forma el valor Ct entre 0 y el obtenido por el control negativo (sin DNA) es considerado válido. Así, los valores de Ct menores que el control indican un resultado positivo, por lo tanto la presencia de una copia de DNA blanco. En base a lo anterior, las muestras positivas entregadas por el valor Ct, se purificaron y secuenciaron, con el fin de comprobar la veracidad del resultado (Mx3000P™ Real-Time PCR System Instruction Manual).

Para ello se procedió a purificar el material genético presente en los filtros con material particulado utilizando kits comerciales. La metodología de mayor rendimiento fue dada por el kit “MagaZorb DNA Miniprep Kit I”, de Promega.

Los amplificados obtenidos mediante PCR fueron precipitados con 150 µl de Isopropanol 75%, incubados por 20 min a temperatura ambiente y centrifugados a 17.000 x g por 25 min. Se eliminó el sobrenadante, luego se agregó 150 µl de etanol 70%, se agitó durante por 10 min. Posteriormente, se centrifugó por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se secó a 37°C por 1 h. Una vez seco el pellet, se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada estéril.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 μ l que contenía tampón de “sensimix Plus SYBR” 1X 0,25 μ M de cada partidor Inner, 2 μ l de DNA templado obtenido a partir de amplificación por PCR. Se utilizó un termociclador en tiempo real STRATAGENE MX3000p utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineación de los partidores a 60 °C por 15 s y elongación a 72 °C por 20 s.

Una vez terminada la amplificación se realizó la disociación del producto amplificado con una temperatura inicial de 70 °C que se fue aumentando gradualmente hasta 95 °C, lo que es denominado curva de disociación

Extracción de DNA desde geles de agarosa

Los fragmentos de DNA obtenidos por la amplificación mediante PCR en tiempo real con el kit “SensiMix Plus SYBR” (Quantace, United Kingdom) se separaron por electroforesis en gel de agarosa (1,5 %) en tampón TAE 1X. Se cortó con un bisturí la zona del gel o banda de interés visualizando el DNA bajo luz UV en un transiluminador. El trozo de gel se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se procedió a la purificación del DNA utilizando el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega corporation, USA). La cantidad de DNA obtenida se determinó con el programa KDS de Kodak.

Secuenciación de los amplicones purificados de DNA desde geles de agarosa

Para ello se preparó cada muestra de amplicon con el kit de secuenciación “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, Applied Biosystem para ser analizada en un equipo de secuenciación 3100-*Avant* genetics Analyzer. Luego de la reacción de secuenciación, el equipo entrega como resultado la secuencia nucleotídica de la muestra problema, mediante un electroferograma (figura 8 A). Los electroferogramas obtenidos fueron analizados utilizando el programa Vector NTI 10.0 (Invitrogene corporation) (figura 8 B). Las secuencias obtenidas, se compararon con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el software Blastn (The Basic Local Alignment Search Tool) que usa la base de datos Gene Bank. Como resultado, se obtiene un listado de secuencias nucleotídicas de la base de datos, su porcentaje de identidad con nuestra secuencia y el nombre del microorganismo.

4. RESULTADOS

4.1. Muestras de material particulado

La figura 1 muestra una fotografía de los 10 filtros colectados.

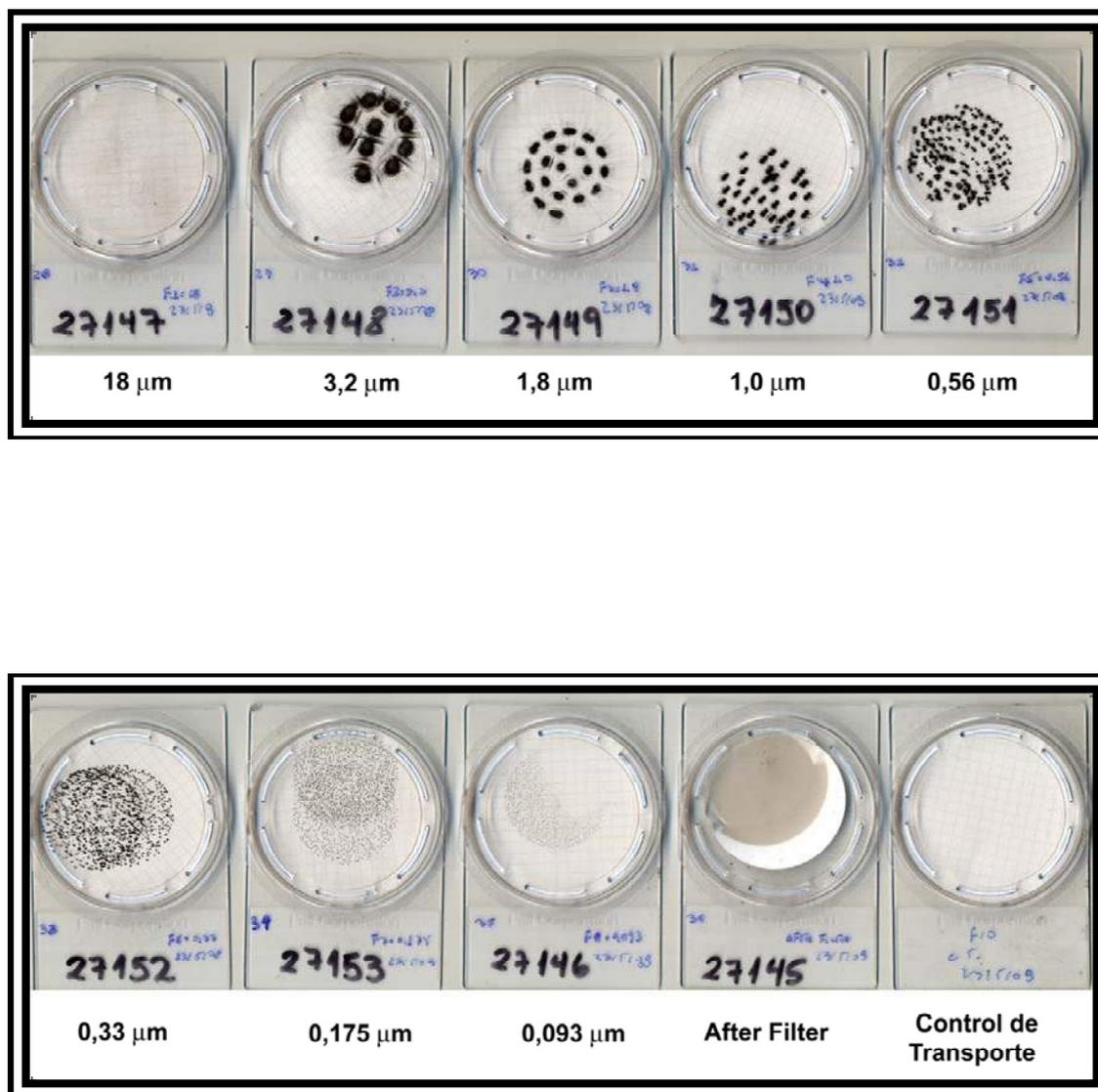


Figura 1: Muestras de material particulado colectadas con impactador de cascada MOUDI de material particulado de los diámetros aerodinámicos de, 18; 3,2; 1,8; 1,0; 0,56; 0,33; 0,175; 0,093 μm , “ultimo filtro” y muestra control de transporte, sobre filtros de nitrocelulosa.

4.2. Cultivo de muestras de contaminación atmosférica a partir de filtros de ésteres/celulosa.

Como resultado de la siembra del material particulado obtenido en sus distintos diámetros aerodinámicos, es posible observar la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) entre los 18 y 1 μm (figura 2), resaltando que la gran mayoría está retenida en el filtro que contiene el diámetro aerodinámico de 3,2 μm .

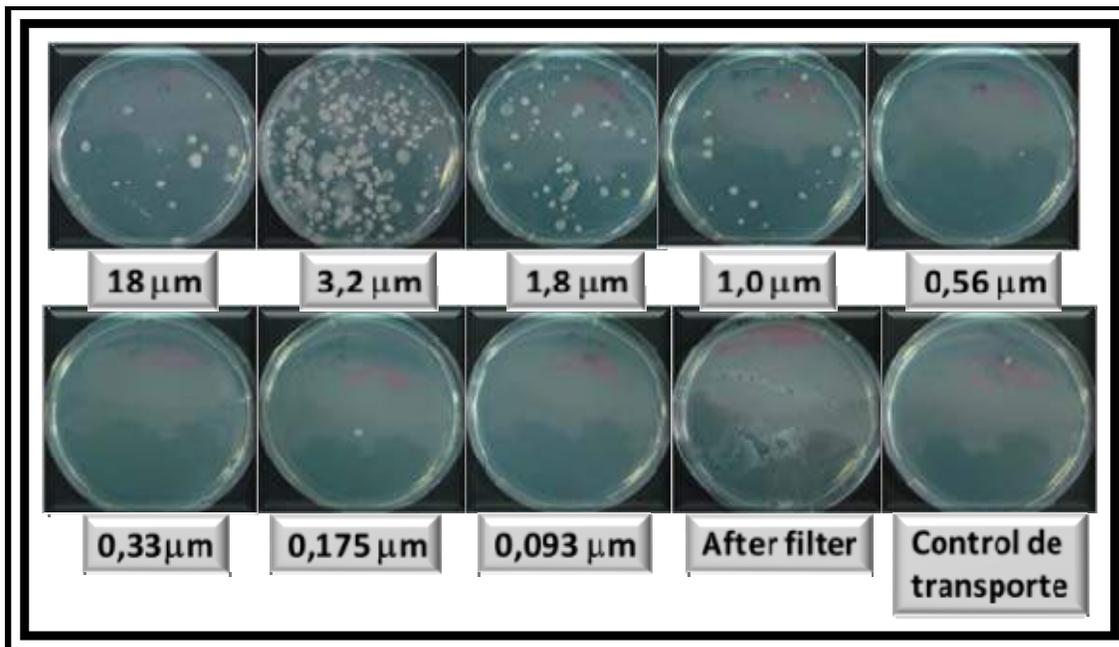


Figura 2: Cultivo en medio sólido Plate-Count. Fotografía de la presencia de microorganismos obtenidos en los filtros de nitrocelulosa con material particulado de diferentes diámetros aerodinámicos.

4.3. Caracterización microbiológica de las muestras de material particulado mediante secuenciación de la región rRNA. 16S.

4.3.1. Extracción de DNA genómico a partir de los microorganismos aislados de las muestras de filtros de nitrocelulosa.

Se obtuvo DNA genómico de las diferentes bacterias utilizando el kit “MagaZorb DNA Miniprep kit I”, de Promega.

En la figura 3 se observa que todas las muestras dieron un buen rendimiento de DNA genómico, tanto en cantidad como en calidad. Sin embargo, en unas pocas se puede observar cierto grado de degradación del DNA. (Carriles 4, 7, 8 y 9). A pesar de ello, el DNA podía ser utilizado en las pruebas de amplificación de la región de los genes de rRNA16S

4.3.2. Amplificación de la región rRNA 16S de los microorganismos aislados en las muestras.

La figura 4 muestra los amplicones obtenidos a partir de DNA genómico purificado de los microorganismos aislados de filtros de nitrocelulosa y amplificados con los partidores de la región rRNA 16S. El tamaño proveniente de estos amplicones fue de aproximadamente 0,8 kb, con pequeñas variaciones (carriles 7, 8 y 11) detectadas luego de la electroforesis. No obstante, estas variaciones en la migración deberán ser determinados mediante secuenciación para saber a qué corresponden los cambios en tamaño de dichos amplicones.

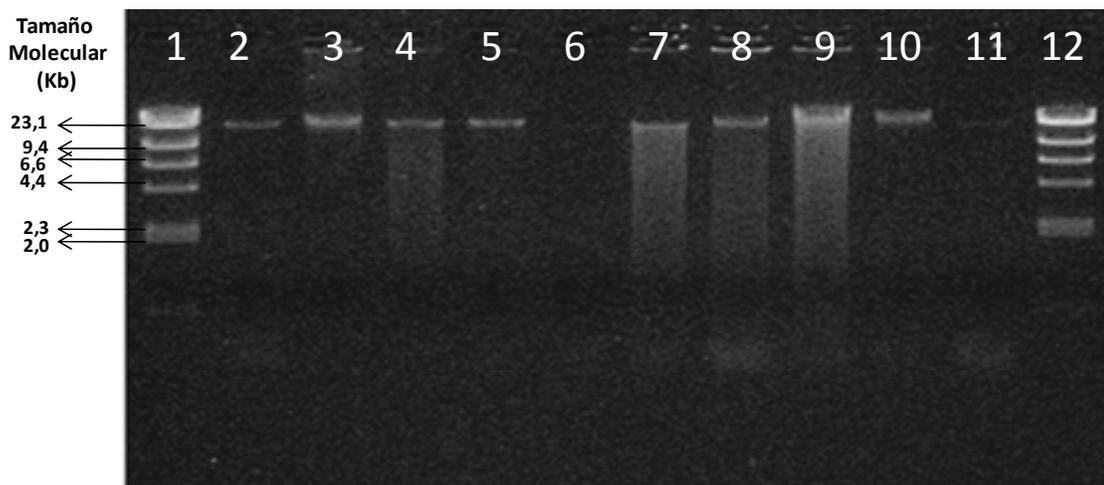


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa (0,7 %) de DNA genómico. correspondiente a distintas bacterias presentes en los filtros con material particulado atmosférico; Carril 1 y 12: marcador de peso molecular fago λ digerido con HindIII; Carriles 2 - 11: DNA genómico provenientes de bacterias, retenidas en diferentes muestras de filtros.

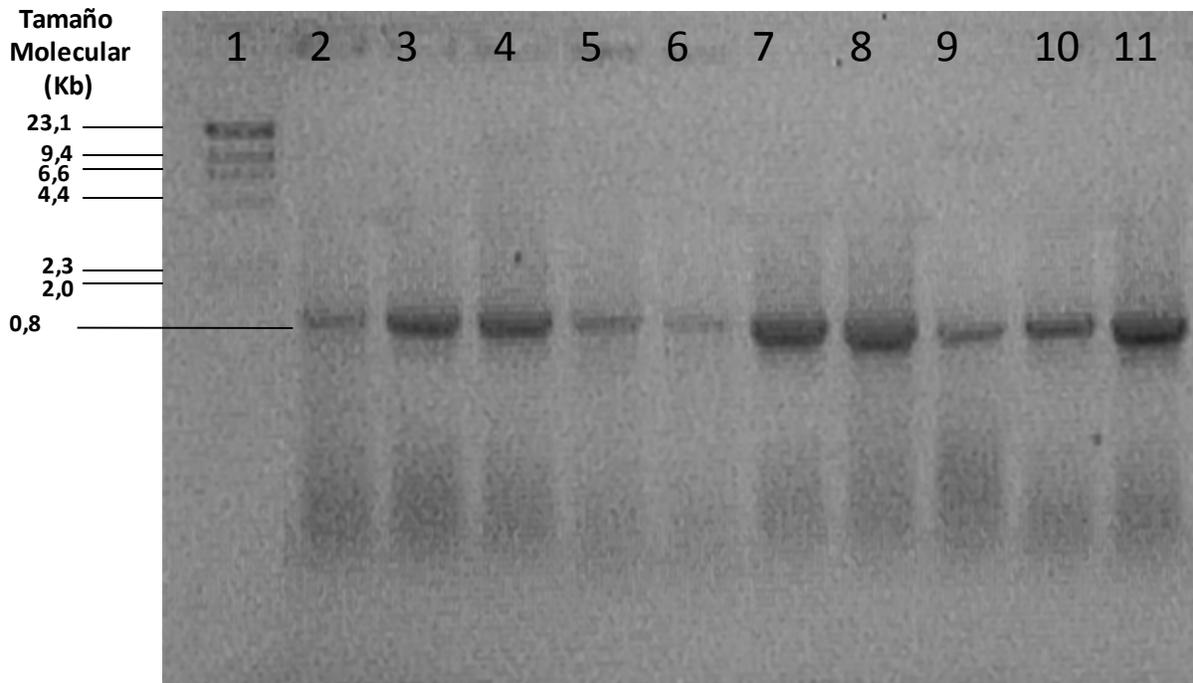


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los amplicones obtenidos a partir de la región rRNA16S. Carril 1: marcador de peso molecular fago λ digerido con *Hind*III; Carriles 2 - 11: amplicones de aproximadamente 0,8 kb de la región rRNA 16S.

4.3.3. Purificación de los amplicones obtenidos de la región 16S rRNA a partir de DNA obtenido de las muestras de filtros de nitrocelulosa.

En la figura 5 se puede observar el buen rendimiento tanto en calidad como en cantidad logrado en todas las muestras. Sin embargo existen diferencias de concentración en los carriles 3, 9 y 11. A pesar de ello, pueden ser utilizados para su secuenciación.

4.3.4. Secuenciación de los amplicones de la región rRNA 16S.

En la tabla II se presenta el nombre de los microorganismos detectados y las características generales de éstos. Las figuras 6^a y 6^b muestran la secuencia nucleotídica y el electroferograma de la bacteria *Bacillus endophyticus* respectivamente, como ejemplo del resultado de la secuenciación. El resto de las secuencias nucleotídicas se encuentran en el anexo 2.

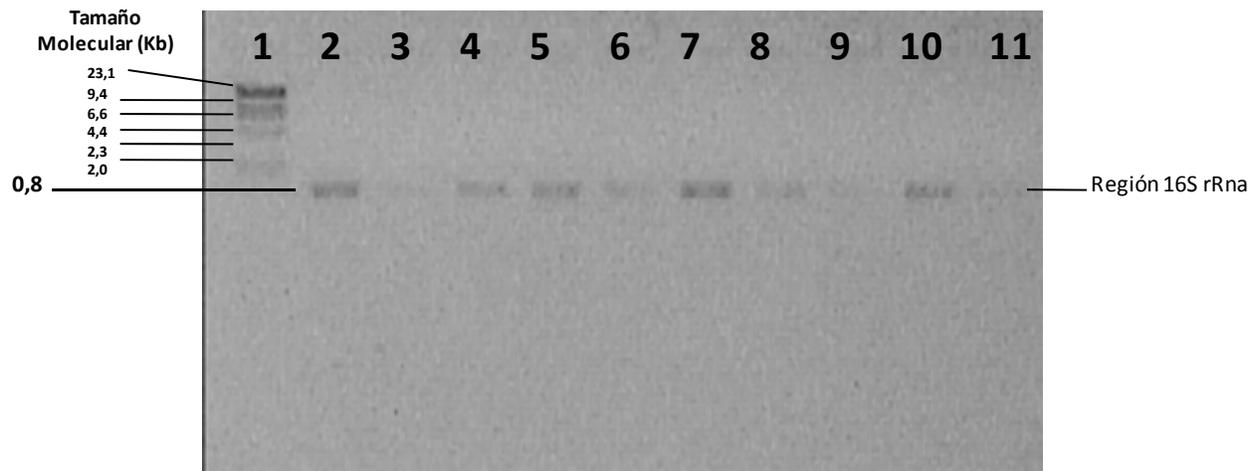


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los amplicones purificados a partir de la región 16S .rRNA. Carril 1: marcador de peso molecular fago λ digerido con *HindIII*; Carriles 2 - 11: amplicones purificados utilizando el kit “*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*”.

Cuadro II
Microorganismos viables presentes en el material particulado comuna de Pudahuel.

Identificación mediante la amplificación y secuenciación de la región rRNA 16S.

Organismo	Características
<i>Bacillus endophyticus</i>	Formador de esporas; Endofítico
<i>Bacillus licheniformis</i>	Formador de esporas; Endofítico
<i>Bacillus pumilus</i>	Formador de esporas; Endofítico
<i>Bacillus subtilis</i>	Formador de esporas; Endofítico
<i>Bacillus mycoides</i>	Formador de espóra; Ubicuo de suelo
<i>Bacillus megaterium</i>	Formador de esporas; Endofítico
<i>Bacillus mojavensis</i>	Formador de esporas; suelos desérticos

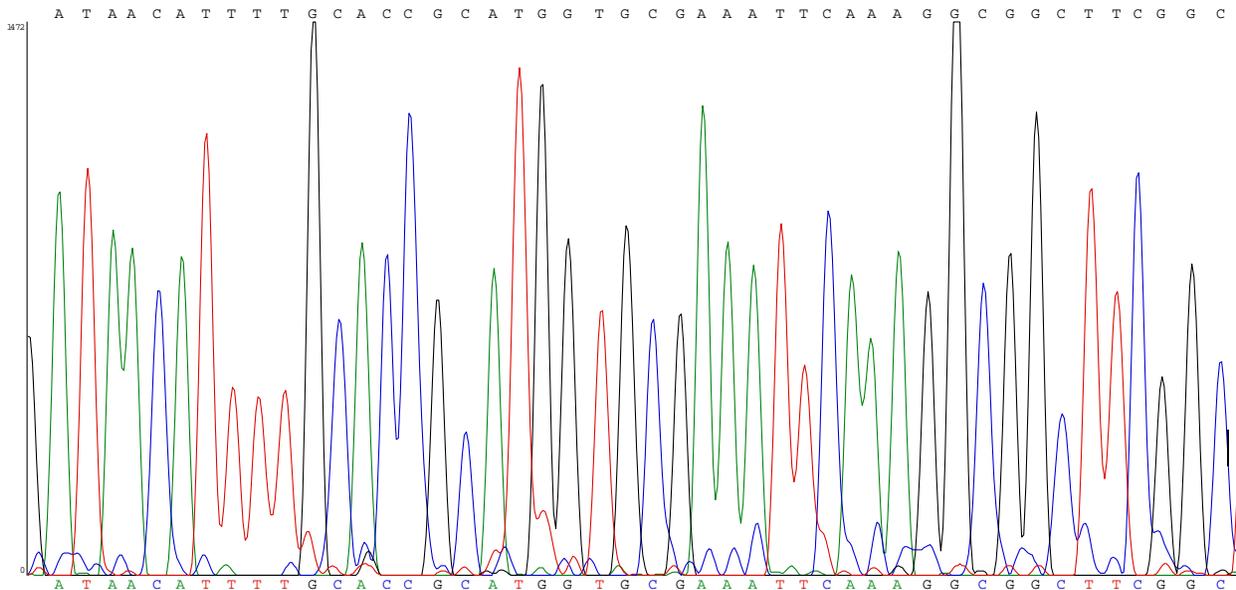


Figura 6 A: Electroferograma. Ejemplo de electroferograma obtenido a partir la secuenciación amplicones de la región rRNA 16S.

Bacillus endophyticus

```

1                                     50
AAACCGGAGCTAATAACCGGATAACACATATCTTCGCATGAGGATATCGTT
51                                     100
AGAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTCAAGGATGGGCCC GCGGCCGCATTAG
101                                    150
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG
151                                    200
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG
201                                    250
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA
251                                    300
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
301                                    350
AAGAACAAGTATCTGTTGAATAAGCAGGTACCTTGACGGTACCTAACCAG
351                                    400
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
401
A

```

Figura 6 b: Secuencia nucleotídica de *B. endophyticus*. Secuencia nucleotídica obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S.

4.3.5 Detección de patógenos respiratorios a partir de DNA total extraído de muestras de material particulado, por medio de PCR en tiempo Real.

La purificación de DNA genómico para patógenos respiratorios mostró un buen rendimiento en calidad de DNA genómico total (figura 7), ya que el DNA obtenido fue utilizado para la reacción de PCR en tiempo real. La baja concentración correspondiente a 20 μ l de un volumen total de 120 μ l, se debe al tipo de muestra y no al rendimiento del kit.

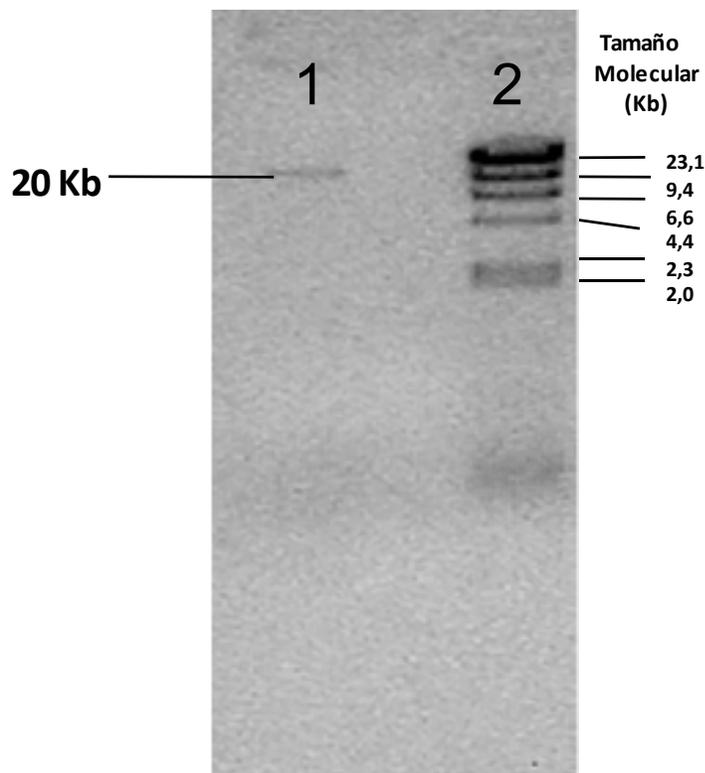


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%); DNA genómico total obtenido de filtros con material particulado de la comuna de Pudahuel. Carril 1: DNA Genómico total purificado con el kit “MagaZorb DNA Miniprep Kit I”; Carril 2: Marcador de peso molecular fago λ digerido con *HindIII*.

4.3.6. Reacción de PCR anidado con PCR en Tiempo Real.

Las muestras positivas entregadas por el valor Ct, fueron purificadas y secuenciadas, con el fin de comprobar la veracidad del resultado (tablas III, IV y V).

La tabla III muestra los resultados de los análisis obtenidos mediante la combinación de las dos técnicas moleculares. Se pueden observar 5 muestras positivas para *S. pneumoniae*, confirmada por la secuenciación de los amplicones producto de la reacción de PCR en tiempo real. También es posible observar dentro de los dos controles de ambiente puro en las localidades de Talagante y Rapel, que esta última presenta como resultado positivo.

En el caso de la tabla IV se puede observar siete muestras positivas para *L. pneumophila*, confirmada también por la secuenciación de los amplicones producto de la reacción de tiempo real. En este caso los controles de ambiente puro de las localidades de Talagante y Rapel, no presentaron resultados positivos.

La tabla V muestra los resultados de los análisis para *H. influenzae*; estos indican la ausencia de la bacteria de esta especie en la reacción de PCR en tiempo real. No obstante, es posible apreciar el resultado positivo del control de ambiente puro en la localidad de Talagante, lo que indica la presencia de esta especie bacteriana en la zona de muestreo de esta localidad.

Cuadro III

Detección de *S. pneumoniae* por PCR en tiempo real en el material particulado de la comuna de Pudahuel.

Streptococcus pneumoniae

Muestra	Ct	(+/-)	Secuencia
07-04-2008	9,19	(+)*	(+)
11-04-2008	14,45	(+)	(+)
18-04-2008	29,96	(-)	(-)
25-04-2008	30,34	(-)	(-)
06-05-2008	26,67	(-)	(-)
13-05-2008	24,73	(-)	(-)
19-05-2008	8,88	(+)	(+)
23-05-2008	24,23	(-)	(-)
30-05-2008	25,35	(-)	(-)
17-07-2008	7,95	(+)	(+)
06-06-2008	33,16	(-)	(-)
24-07-2008	32,84	(-)	(-)
07-08-2008	28,37	(-)	(-)
31-07-2008	29,65	(-)	(-)
14-08-2008	15,91	(+)	(+)
28-08-2008	No Ct	(-)	(-)
Control Talagante	25,19	(-)	(-)
Control Rapel	12,74	(+)	(+)
DNA <i>S.pneumoniae</i>	9,16	(+)	(+)
Agua PCR	No Ct	(-)	(-)
Agua Real-time	24,72	(-)	(-)

* De color rojo se encuentran las muestras positivas dadas por el valor Ct y confirmadas por secuenciación.

Cuadro IV
Detección de *L. pneumophila* por Real-Time en el material particulado de la comuna de Pudahuel.

<i>Legionella pneumophila</i>			
Muestra	Ct	(+/-)	Secuencia
07-04-2008	No Ct	(-)	(-)
11-04-2008	33.85	(-)	(-)
18-04-2008	9.56	(+)*	(+)
25-04-2008	No Ct	(-)	(-)
06-05-2008	16.35	(+)	(+)
13-05-2008	12.34	(+)	(+)
19-05-2008	No Ct	(-)	(-)
23-05-2008	No Ct	(-)	(-)
30-05-2008	16.65	(+)	(+)
17-07-2008	25.88	(-)	(-)
06-06-2008	10.98	(+)	(+)
24-07-2008	22.59	(-)	(-)
07-08-2008	19.21	(+)	(+)
31-07-2008	15,62	(+)	(+)
14-08-2008	No Ct	(-)	(-)
28-08-2008	23.75	(-)	(-)
Control Talagante	29.31	(-)	(-)
Control Rapel	34.64	(-)	(-)
DNA <i>L.pneumophila</i>	8.98	(+)	(+)
Agua PCR	21.74	(-)	(-)
Agua Real-time	25.13	(-)	(-)

* De color rojo se encuentran las muestras positivas dadas por el valor Ct y confirmadas por secuenciación.

Cuadro V
Detección de *H. influenzae* por Real-Time PCR en el material particulado de la comuna de Pudahuel.

<i>Haemophilus influenzae</i>		
Muestra	Ct	(+/-)
07-04-2008	No Ct	(-)
11-04-2008	No Ct	(-)
18-04-2008	No Ct	(-)
25-04-2008	No Ct	(-)
06-05-2008	No Ct	(-)
13-05-2008	33.33	(-)
19-05-2008	26.97	(-)
23-05-2008	No Ct	(-)
30-05-2008	No Ct	(-)
17-07-2008	33.44	(-)
06-06-2008	No Ct	(-)
24-07-2008	33.70	(-)
07-08-2008	No Ct	(-)
31-07-2008	No Ct	(-)
14-08-2008	No Ct	(-)
28-08-2008	21.49	(-)
Control Talagante	17.35	(+)
Control Rapel	No Ct	(-)
DNA <i>L.pneumophila</i>	12.61	(+)
Agua PCR	19.84	(-)
Agua Real-time	33.27	(-)

Resultado de la detección de *H. influenzae*, utilizando la reacción de PCR en tiempo real dadas por el valor Ct.

5.0. Discusión

5.1. Cultivo en agar de recuento de las muestras obtenidas del material particulado.

La atmósfera es un ambiente muy hostil para los microorganismos por las bajas temperaturas y sus bruscos cambios los cuales son considerados un factor importante para la actividad microbiológica, asociados además a la humedad, radiación y disponibilidad de sustratos (Deguillaume y cols., 2008; Brodie. y cols., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo, indican la presencia de bacterias del género *Bacillus*, dentro de los cuales se detectan *B. endophyticus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*; algunas de estas especies son comunes en la microflora de los tejidos internos de distintas plantas y juegan un papel importante en la protección de éstas, contra hongos fitopatógenos (Reva y cols., 2002), y otros son especies comunes de suelos desérticos (Goodwin y cols., 1994, Nakamura y Jackson, 1995).

Sin embargo, el material particulado producto de la contaminación atmosférica, podría ser un ambiente más hostil, disminuyendo la microbiota debido a la presencia de compuestos químicos presentes en la fracción particulada. Dado esto existen algunos microorganismos que se encuentran en forma de células vegetativas, pero lo más frecuente es formando esporas, ya que éstas son metabólicamente menos activas y sobreviven en condiciones adversas como las descritas anteriormente. Las esporas pueden ser producidas por hongos, algas, líquenes, algunos protozoos y bacterias. Dentro de estas se encuentran especies de los géneros *Bacillus*, *Clostridium* y *Actinobacterias* que son los aislados con mayor frecuencia (De la Rosa y Úllacan, 2002). Lo anterior es coherente con los

resultados obtenidos en este trabajo, ya que observamos la presencia predominante del género *Bacillus*, entre las bacterias viables del material particulado de la contaminación atmosférica de Santiago. Cabe destacar que ninguno de los organismos encontrados, han sido descritos como riesgosos para la salud del ser humano (Reva y cols., 2002; Goodwin y cols., 1994; Nakamura y Jackson, 1995).

Se detectaron estos microorganismos en el material particulado con diámetros aerodinámicos de 3,2 y 1,0 μm . La importancia de este hallazgo radica en que las partículas finas cuyos diámetros aerodinámicos son menores a 2,5 μm tienen la capacidad de penetrar fácilmente en los bronquios terminales y los alvéolos (Oyarzun, 2010; Gil, 1996) por lo tanto, podrían ser un medio de transporte de bacterias patógenas. Si bien los microorganismos detectados mediante cultivo no presentan peligrosidad para el ser humano, solo el 1% de las bacterias que se encuentran en el medio ambiente son cultivables (Handelsman, 2004, Amann y cols., 1995) pudiendo encontrarse microorganismos patógenos no detectados e ingresar utilizando como medio de transporte estas partículas.

Estos resultados refuerzan la necesidad de tener una norma de calidad de aire para la fracción $\text{MP}_{2,5}$, la cual es considerada como potencialmente más peligrosa que la fracción MP_{10} , debido que la norma MP_{10} no discrimina entre sustancias más agresivas o inocuas presentes en el material particulado.

Los beneficios que traería la norma $\text{MP}_{2,5}$ sería una disminución considerable del impacto negativo sobre la salud de la población expuesta más susceptible, como es el caso de los niños y ancianos.

5.2 Detección de patógenos respiratorios a partir de DNA total extraído de muestras de material particulado

La contaminación atmosférica por material particulado en periodos de alta contaminación está asociada a la mayor incidencia de enfermedades respiratorias. Esto se ve reflejado en un aumento de las consultas por infecciones respiratorias agudas, como neumonía (Morale, 2006; Carrasco y Richard, 2006; Bruenkreef y Forsbergb, 2005; Barrios y cols., 2004; Prieto y cols., 2007). Lo anterior se confirma en los datos proporcionados por el departamento de estadísticas del consultorio La Estrella, de la comuna de Pudahuel, los cuales fueron entregados directamente por este departamento y en donde se muestra el aumento de infecciones respiratorias agudas, que pueden ser causados por virus o bacterias (figura 8). La inhalación de partículas contaminantes, incrementa la susceptibilidad a estas enfermedades y su gravedad (Mims y cols., 2001).

La detección en este trabajo de las especies bacterianas *S. pneumoniae* y *L. pneumophila*, dentro de las cuales, la primera se encuentra como principal agente etiológico autóctono de la neumonía adquirida en comunidad (NAC) del ser humano, sitúa a estos microorganismos en el ambiente, lo que no quiere decir que éstos sean viables para generar enfermedades al ser humano.

No obstante, existe una interacción entre los virus de la influenza y los pneumococcus, en la cual las infecciones primarias causadas por virus, predisponen a las enfermedades secundarias causadas por bacterias, incluyendo a los microorganismos *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma pneumoniae* y *S. pneumoniae* (McCullers, 2006).

En el caso de *S. pneumoniae*, este microorganismo es transmitido por contacto directo, tos y estornudos, no así *L. pneumophila*, el cual es un agente infeccioso ambiental, el que se transmite al hombre mediante bioaerosoles (Ulloa, 2008).

Tomando en cuenta que dentro de los medios de transmisión de un gran número de agentes infecciosos, que afectan al aparato respiratorio, se encuentra el aire, los bioaerosoles generados por secreciones nasales, tos y estornudos son capaces de diseminar microorganismos patógenos. Además, considerando que la mitad de los bioaerosoles presentan un tamaño menor a 10 μm , se favorecería la penetración de los microorganismos patógenos a las vías respiratorias (García, 1999; Álvarez, 2003; Aliste, 2007; Arancibia y Díaz, 2005). Junto a lo anterior y sumado a que ciertas condiciones invernales (las bajas temperaturas, el aumento de la humedad y la disminución de la velocidad del viento; ver figura 8), harían menos hostil al ambiente para los microorganismos, favoreciendo la presencia y supervivencia de estos (De la Rosa y Úllacan, 2002), los cuales podrían actuar como agente oportunista, en conjunto con la acción de virus durante periodos invernales.

En relación a los ambientes intradomiciliarios existen antecedentes de que en ellos se generan condiciones favorables para la presencia de hongos, bacterias y virus, los que representan un riesgo para la población (Cáceres y cols., 2001, Rivas y cols., 2008), por lo que sería importante la detección de microorganismos patógenos específicos en este tipo de ambientes.

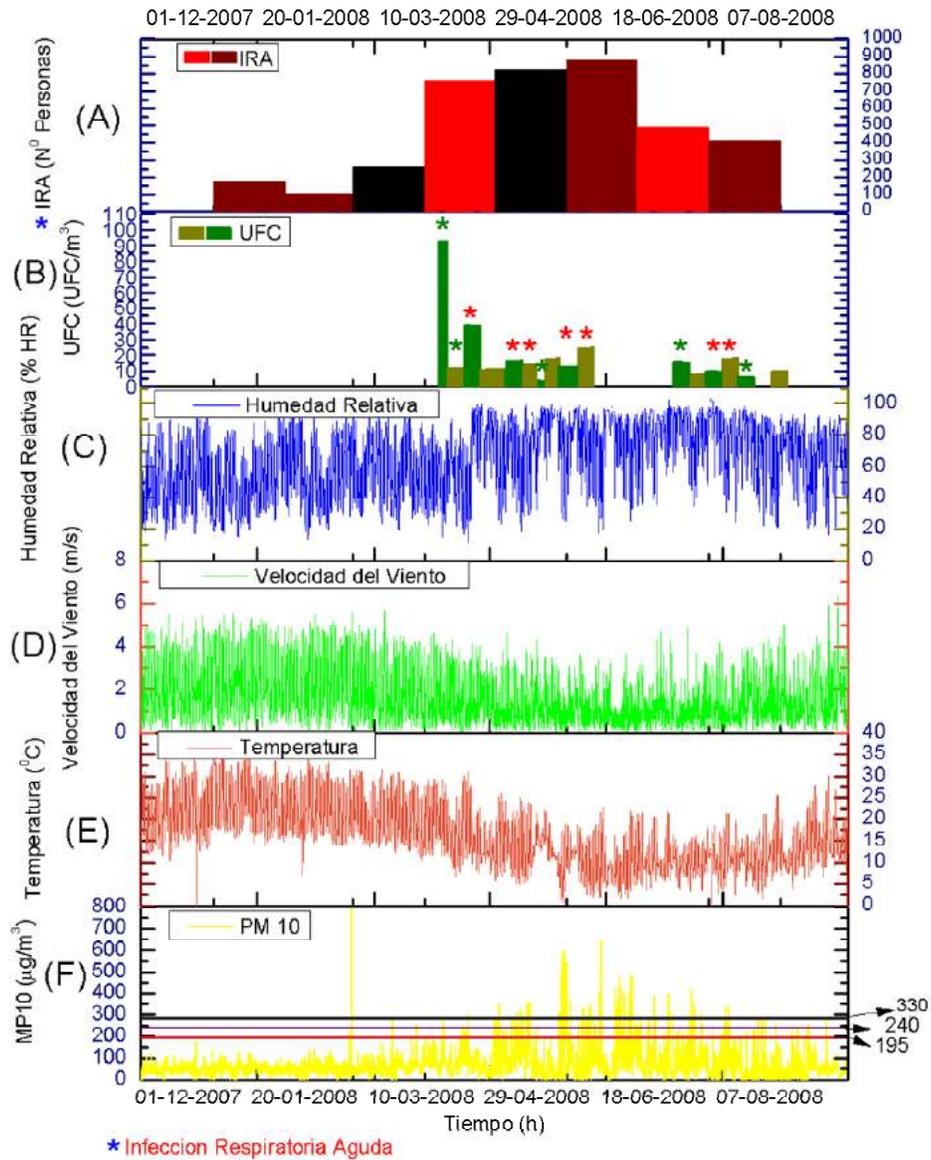


Figura 8: Presencia de los microorganismos *S. pneumoniae* y *L. pneumophila*. **A:** Infecciones respiratorias agudas (N° De personas); **B:** Unidades formadoras de colonias (UFC /m³), donde los asteriscos de color verde, muestran los puntos en que se detectó *S. pneumoniae*, los asteriscos de color rojo, muestran los puntos en que se detectó *L. pneumophila*; **C:** % Humedad relativa; **D:** Velocidad del viento (m/s); **E:** Temperatura (°C); **F:** Concentración de material particulado menor a 10 micrones (µg/m³): 330 µg/m³ emergencia, 240 µg/m³ pre-emergencia y 195 µg/m³ alerta.

6.0. Conclusión.

Por medio de la utilización de la microbiología clásica, en conjunto con técnicas moleculares, se detectó la presencia de bacterias del genero *Bacillus*, en los diámetros aerodinámicos 3,2 y 1,0 μm del material particulado; tomando en cuenta que solo el 1% de las bacterias es cultivable y sumado a que el tamaño aerodinámico menor a 2,5 μm penetra fácilmente los alvéolos, estos resultados entregan nuevos antecedentes que refuerzan la necesidad de normar el $\text{MP}_{2.5}$.

La presencia de los microorganismos *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila* no establece ni descarta patogenicidad, ni efectos adversos para el ser humano, dejando una ventana abierta para dilucidar así sus efectos.

La detección de microorganismos patógenos en muestras de contaminantes atmosféricos mediante las técnicas moleculares descritas, es un importante indicador para realizar seguimientos de microorganismos en diferentes sectores con altos índice de contaminación atmosférica con el objetivo de conocer si existe diversidad respecto a éstos.

La metodología desarrollada es aplicable a la detección de especies biológicas en ambientes cerrados, ya sean domiciliarios o sistemas de comunicación masiva. En al caso del primero, esto permitiría conocer los microorganismos específicos que afecten la salud de la personas y así orientar la gestión en la generación de medidas de mitigación, mejorando la salud y por ende la calidad de vida de la población expuesta.

En el caso del sistema de comunicación masiva, es posible generar un monitoreo y control de los espacios públicos de convivencia masiva, mejorando el control de la ventilación o implementando nuevos sistemas o medidas para evitar la propagación o el aumento de microorganismos patógenos.

7.0 Bibliografía.

Adonis M., Gil L., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbon levels and mutagenicity of inhalable particulate matter in Santiago, Chile. *Inhalation toxicology*. 12(12):1173-83.

Álvarez. A.M. 2003. Neumonía adquirida en la comunidad en niños: Aplicabilidad de las guías clínicas. *Revista Chilena de Infectología*. 20: 59-62.

Aliste V. 2007 Neumonía del adulto adquirida en la comunidad. *Revista Médica Clínica las Condes*. 18(2):81-86.

Amann R., Ludwig W., Schleifer K. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59: 143-169.

Arancibia F., Díaz O. 2005. Neumonía grave del adulto adquirida en la comunidad. *Revista Chilena de Infectología*. 22(supl 1): 46-51.

Atlas R. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease, pathology, detection and control. *Environmental Microbiology*; 4: 283-293.

Atlas R., y Bartha, R. 2002 *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Pearson Educación, Madrid, edición en español. Capítulo 9. Páginas: 329-331

Brodie E., DeSantis T., Parker J., Zubieta I., Piceno Y., Andersen G. 2006. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(1): 299–304.

Barríos, S., Peña .F., Osses. S. 2004. Efectos de la contaminación atmosférica por material particulado en las enfermedades respiratorias aguda en menores de 4 años. *Ciencia y Enfermería* X(2)21-19.

Brunekreef B. y Forsberg B. 2005. Evidencia epidemiológica de los efectos de las partículas gruesas aerotransportadas en la salud. *European Respiratory Journal* J. 6: 309-318.

Carrasco C y Richard C. 2006, Beneficios económicos por reducción de Contaminación Atmosférica según Grupos etarios en Temuco, Departamento de Economía, Universidad de Concepción, Chile.

Casas B., Peña-Cortés S., Osses B. 2004. Efectos de la contaminación atmosférica por material particulado en las enfermedades respiratorias agudas en menores de 5 años. *Ciencia y Enfermería*. 10 21-29.

Cáceres D., Adonis M., Retamal C., Ancic P., Valencia M., Ramos X., Olivares N., Gil L. 2001. Contaminación intradomiciliaria en un sector de extrema pobreza de la comuna de La Pintana. *Revista Médica de Chile*. 129(1): 33-42.

Cañete P. 1999. Diagnostico etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad. *Boletín de la escuela de medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile*. 28.

Cianciotto N., Eisenstein B., Mody C., Toews G., and Engleberg. C. 1989 A Legionella pneumophila Gene Encoding a Species-Specific Surface Protein Potentiates Initiation of Intracellular Infection. *Infection and Immunity*. 57:1255-1262.

Cifuentes L. , Vega J., Köpfer K., Lave L. 2000. Effect of the fine fraction of particulate matter versus the coarse mass and other pollutants on daily mortality in Santiago, Chile. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 50(8):1287-98.

CONAMA. Artículo 1193. <http://www.conama.cl/rm/568/article-1193.html>.

CONAMA, Actualización de inventario de emisiones de contaminantes atmosféricos en la región metropolitana. 2005. <http://www.conama.cl/portal/1301/channel.html>

CONAMA, Plan de Prevención y Descontaminación Atmosférica de Santiago.1997 (PPDA). <http://www.conama.cl/portal/1301/channel.html>

CONAMA, 1990 Decreto Supremo N° 32. <http://www.conama.cl/portal/1301/channel.html>

Chandra P., Venkata S., Jayarama S. 2005. Assessment of microbial (bacteria) concentrations of ambient air at semi-arid urban region: influence of meteorological factors, *Applied Ecology and Environmental Research* 3: 139-149.

Dales R., Cakmak S, Vidal C. 2009 Air pollution and hospitalization for headache in Chile. *American Journal of Epidemiology*.15; 170(8):1057-66.

Dales R y Vidal C. 2010. Air pollution and hospitalization for venous thromboembolic disease in Chile. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*. 8(4):669-674.

Deich R., Metcalf B., Finn C., Farley J., and Green B. 1998. Cloning of Genes Encoding a 15,000 Dalton Peptidoglycan Associated Outer Membrane Lipoprotein and an Antigenically Related 15,000-Dalton Protein from *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*.170:489-498.

Deguillaume L., Leriche M., Amato P., Ariya P., Delort M., Poschl U., Chaumerliac Bauer N., Flossmann I., Morris E. 2008. Microbiology and atmospheric processes: chemical interactions of Primary Biological Aerosols. *Biogeosciences Discuss*. 5:841–870.

De la Rosa M y Ullácan C. 2002, El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos, *Observatorio Medioambiental* ISSN: 1139-1987 Vol. 5: 375-402.

Fliermanns C., Chery W., Orrison L., Smith SJ, Tison D., Pope D. 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environmental Microbiology* . 41:9-16.

García C., Lozano J., Rivera A., Rocha-gracia R., Giono Silvia. 2008. Identificación y tipificación de *Haemophilus influenzae* mediante PCR múltiple. Universidad de Medicina Bogotá (Colombia). 49(4), 436-452.

García P. 1999. Diagnostico etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad. Boletín de la escuela de medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. 28.

Gil L., King L., Adonis M. 2000. Trends of polycyclic aromatic hydrocarbon levels and mutagenicity in Santiago's inhalable airborne particles in the period 1992-1996. *Inhalation Toxicology*, 12: 1185-1204.

Gil L. 1996. Efectos toxicológicos de la contaminación atmosférica en la salud humana. Jornada internacional GNC combustible limpio para una mejor calidad de vida.

Goodwin A., Spencer R., Grizzle J., Goldsby T. 1994. *Bacillus Mycoides*: a Bacterial pathogen of channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms*.18:173-179.

Handelsmann J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68:669-685.

Janda M., Abbott S. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls (minireview). *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9): 2761-2764.

Jiménez P. y Calvo M. 2005, Diagnóstico Microbiológico de la Neumonía del Adulto adquirida en la comunidad. *Revista Chilena Enfermedades Respiratorias* 21: 95-101.

Jones A. y Harrison R. 2003. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations. *Science of the Total Environment*, 326(1-3): 151-180.

Jensen P. 1997. Airborne Mycobacterium spp. En: De la rosa, et al., 2002. En: El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos, Observatorio Medioambiental ISSN: 1139-1987 Vol. 5: 375-402.

Lin W. y Li C. 2000. Associations of fungal aerosols, Air Pollutants, and Meteorological Factors. Aerosol Science and Technology 32:359-368.

Nakamura L. y Jackson A. 1995. Clarification of the Taxonomy of Bacillus mycoides. International Journal of Systematic Bacteriology. 45(1):46-49.

McCullers J. 2006. Insights into the Interaction between Influenza Virus and Pneumococcus. Clinical Microbiology Reviews. 19(3):571-582.

Martínez I. 2005. Caracterización de aislamientos de *Haemophilus influenzae* en Cuba. Tesis para optar al grado de doctor en ciencias de la salud. Instituto de medicina tropical “Predro Kuri”. Laboratorio nacional de infecciones respiratorias agudas bacterianas. Laboratorio nacional de referencia de *Haemophilus* y *Streptococcus*.

Mx3000P™ Real-Time PCR System Instruction Manual. Páginas 1; 169-186; 190-197.

Messmer O y Whitney G. 1997. Use of polymerase chain reaction to identify pneumococcal infection associated with hemorrhage and shock in two previously healthy young children. Clinical Chemistry.46: 930-035.

Mims C., Nash A., Stephen J. 2001. Pathogenesis of Infection Disease Fifth Edition. Paginas: 385-387

Morales R. Contaminación Atmosférica. 2006. Santiago de Chile, Editorial Universitaria. Páginas: 30-32; 56-66; 108, 109: 160-162; 305-314.

Oyarzún M. Contaminación aérea y sus efectos en la salud. 2010. Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias. 26:16-25.

Oliveira M., Ribeiro H., Abreu I. 2005. Annual variation of fungal spores in atmosphere of porto, Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 12, 309–315.

Parra E., Castañeda E., Moreno J. 2007. Identificación de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* por reacción en cadena de la polimerasa. Biomédica. 27:454-60.

Prieto M., Mancilla P., Astudillo P., Reyes A., Román A. 2007. Exceso de morbilidad respiratoria en niños y adultos mayores en una comuna de Santiago con alta contaminación atmosférica por partículas. Revista Médica de Chile. 135: 221-228.

Puigdueta A y Fernandez J. Infecciones por *streptococcus pneumoniae*. 1998. Medicine. 7(78):3615:3617.

Prado V. 2001. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. Revista Chilena de Infectología. 18(supl 1) 6:9.

Rivas E., Barrios S., Dorner A., Osorio X. 2008. Fuentes de contaminación intradomiciliaria y enfermedad respiratoria en jardines infantiles y salas cunas de Temuco y Padre Las Casas, Chile. Revista Médica de Chile. 136: 767-774.

Reva O., Smirnov. V., Pettersson B., Priest F. 2002. *Bacillus endophytivus* sp. Nov. isolate from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 101-107.

Romero R., Sienna R., Richter P. 2002. Efficient screening method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particles. Application in real samples of Santiago-Chile metropolitan urban area. Atmospheric Environment, 36: 2375-2381.

Romeu C., Boquet M., Boquet E. 2003. Prevalencia de *Legionella pneumophila* en torres de refrigeración sometidas a mantenimiento preventivo (Cataluña. España). *Diagnostico In Vitro*. 1: 1-18.

Romokroger C. 1990. Elemental Analysis of Airborne-Particulates in Chile. *Environmental Pollution*. 68: 161-170.

Saldias P., Pavìe. G. 2005, Evaluación de la gravedad en la neumonía del adulto adquirida en la comunidad. *Revista Chilena Enfermedades Respiratorias* 21: 103-110.

Sanhueza P., Torreblanca M., Diaz-Robles L., Schiappacasse L., Silva M., Astete T. 2009. Particulate air pollution and health effects for cardiovascular and respiratory causes in Temuco, Chile: a wood-smoke-polluted urban area. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 59(12):1481-8.

Sierra M., Préndez M., Romero R. 2002. Methodology for the extraction, clean-up and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban particulate matter. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 47: 311-324.

Terrés S., Méndez M., Hernández T., Martínez M. 1996. Contaminación atmosférica e infección respiratoria en la Ciudad de México, *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 43: 104-112.

Ulloa M. 2008. Retrato microbiológico: *Legionella pneumophila*. *Revista Chilena de Infectología*. 25(3):208.

Weisburg W., Barns S., Elletierdale A., Lane D. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. 173: 697-703.

Anexo1

A

```
1 50
TTATTTTACTGTAATCAAGCCATCTGGCTCTACTGTGAATTCTGGCCTGT
51 100
CTGCCAGTGTTCGGTCTGGTTTGAGGTAGTACCAGCCTGTTCCGTCCGCT
101 150
GACTGGATAAAGGCATTTGATACCATGGCGCCTTCTTTAGCGTCTAAGTA
151 200
GTACCAAGTGTCTTTGTACTTGACCCAGCCTGTCTTCATGGCACCTTCTT
201 250
CGTTGAAATAGTACCACTTATCAGCGATTTTCTTCCAGCCTGTAGCCATT
251 300
TCGCCTGAGTTGTCGAACCAGTACCAGTTGCCGTCTGTGTGCTTCCCTCCA
301 350
GCGGTCTGCAAGCATATAGCCTGAACTGTCAAAGTAGTACCAAGTGCCAT
351 400
TGATTTTCTCAAACCTTGTCTTTGGATAAGAGCCGTCTGAATGTACGTAC
401 450
CAGTAGCCAGTGTCAATTCTTCTGCCAGCCTGTTTCAATCGTCAAGCCGTT
451 500
CTCAATATCATGCTTAAACTGCTCACGGCTAATGCCCCATTTAGCAAGAT
501 550
ATGGATAAGGGTCAACGTGGTCTGAGTGGTTGTTTGGTTGGTTATTCGTG
551 600
CAATACTCGTGC GTTTTAATTCAGCTAAACTCCCTGTATCAAGCGTTTT
601 650
CGGCAAACCTGCTTCATCTGCTAGATTGCGTAAGAGTTCGATATAAAGGC
651 700
GGTAGTCCGTCATGAACTCTTCTTTGGTTGAATGGCTTTCAATCAGTTCA
701 750
ACCGCTGCATAGGTCTCAGCATTCCAACCGCCCCAACGTCCAGGCACC
751 800
ATTATCAACAGGTCCTACCTGCATGATGCAACCGTTCCCAACAATGTGCG
801 850
AGAAAAACCTAATTCTGGGTCTTCCGCCAGTGATAATCCGCTTCATTC
851 900
GTACGTTGAATGCGGATTCCAGTTGAGTGTGCGTGTACTTGCCTATA
901 950
TGGTTGCACGCCGACTTGAGGCAAATCTGTTCTTAATTTACTCACATTAA
951
TTTCCAT
```

Figura A. Secuencia completa del gen *lytA* de *S. pneumoniae* obtenido de la base de datos del NCBI, número de acceso M13812.1. En color celeste se muestran las zonas de los partidores Real_LytA_Outer Fw y Rev, utilizados para amplificar un fragmento de 288 pb; En color verde se encuentran las zonas de los partidores Real_LytA_Outer Fw y Rev que amplifican un fragmento de 180 pb, dentro del fragmento de 288 pb.; En color amarillo se muestra la zona compartida entre los partidores LytA_Outer Rev y LytA_Inner Rev.

B

```
1 50
ATAAGTTGTCTTATAGCATTGGTGCCGATTTGGGGAAGAATTTTAAAAAT
51 100
CAAGGCATAGATGTTAATCCGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCAAGACGC
101 150
TATGAGTGGCGCTCAATTGGCTTTAACCGAACAGCAAATGAAAGACGTTC
151 200
TTAAACAAGTTTCAGAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAAT
201 250
AAGAAAGCGGATGAAAATAAAGTAAAAGGGGAAGCCTTTTTAACTGAAAA
251 300
CAAAAACAAGCCAGGCGTTGTTGTATTGCCAAGTGGTTTGCAATACAAAG
301 350
TAATCAATTCTGGAAATGGTGTAAACCCGGAAAATCGGATTACAGTCACT
351 400
GTCGAATACACTGGTCGTCTGATTGATGGTACCGTTTTTTGACAGTACCGA
451 500
AAAAACTGGTAAGCCAGCAACGTTCCAGGTTTCACAAGTTATCCCTGGAT
501 550
GGACAGAAGCTTTGCAATTGATGCCCGCTGGATCAACTTGGGAAATTTAT
```

Figura B. Secuencia parcial del gen *mip* (proteína potenciadora de la infectividad del macrófago) de *L. pneumophila* obtenido del la base de datos del NCBI, número de acceso EU047283.1. En color celeste se encuentran las zonas de los partidores Real_*Legionella pneumophila* _Outer Fw y Rev, utilizados para amplificar un fragmento de 339 pb; En color verde se encuentran las zonas de los partidores Real_*Legionella pneumophila* _Inner Fw y Rev utilizados para amplificar un fragmento de 266 pb dentro del fragmento de 339 pb.

C

```
1 50
TTAGTACGCTAACACTGCACGACGGTTTTTAGAATATGCAGCTTCATCAT
51 100
GACCTAATACTGCAGGTTTTTCTTCACCGTAAGATACTGTGCCTAATTTA
101 150
CCAGCATCAACACCTTTACCAGCTAAATAACCTTTAACTGCATCTGCACG
151 200
ACGTTGGCCTAATGCGATGTTGTATTCTGGTGTACCACGTTTCATCAGTGT
201 250
TACCTTCTACTAATACTTTAGCAGCTGGCGTTGCATTTAAATATGCAGCG
251 300
TGCGCATCTAAGATTTGAACGTATTCACCAGTAATGTCATATTTATCAAA
301 350
ACCGAAATAAACGGTATTGTAACGTTGTTGAAGATCAGCAACAGAGTAAC
351 400
CGCCAAAAGTTTGAGCAGCACCATTGCCTGCAGCATCGTTGTTAGATGAA
401 450
CTACAAGCTGCTAATGCAGCTACAGAACCTGCAACTAATAATGATTTAAC
451
AAATTTGTTTCAT
```

Figura C. Secuencia completa del gen *p6* de *H. Influenzae* obtenido de la base de datos del NCBI, número de acceso CP000057.2. En color celeste se encuentran la zonas de los partidores Real_ *Haemophilus influenzae* _Outer Fw y Rev, utilizados para amplificar un fragmento de 255 pb; En color verde se encuentran los partidores Real_ *Haemophilus influenzae* _Inner Fw y Rev utilizados para amplificar un fragmento de 182 pb dentro del fragmento de 255 pb.

Anexo2

A

Bacillus licheniformis

```
1 50
AATACATGGCAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGC
51 100
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAA
101 150
CTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTC
151 200
AATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC
201 250
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCG
251 300
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
301 350
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
351 400
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTTGT
401 450
TAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTA
451 500
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
501
TGGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
```

Figura A: Secuencia nucleotídica de *B. licheniformis*. Secuencia nucleotídica obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. Al compararla con la base de datos de NCBI, arrojó como mayor porcentaje de identidad de la bacteria *Bacillus licheniformis*.

B

Bacillus pumilus

```
1 50
GCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGCATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT
51 100
AACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGA
101 150
GCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGG
151 200
TTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGG
201 250
GGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
251 300
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
301 350
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG
351 400
TGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG
401 450
CGAGAGTAACTGCTCNCACCTTGACCGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGC
451 500
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTANGTGGCAAGCGTNGTCCG
501
GAATTATTGGGCG
```

Figura B: Secuencia nucleotídica de *B. pumilus*. Secuencia nucleotídica obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. Al compararla con la base de datos de NCBI, arrojó como mayor porcentaje de identidad de la bacteria *Bacillus pumilus*.

C

Bacillus subtilis

```
1 50
TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
51 100
GGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTG
101 150
GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
151 200
AGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
201 250
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAG
251 300
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
301 350
GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
351 400
ACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
401 450
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTTAATACGTACGTGGCNAGCGTTGTC
451 500
CGNAATNATCGGNCGTAAAGGGCTCCANGCCGGTTTCTTAACTCTGATGT
501
GAAAG
```

Figura C: Secuencia nucleotídica de *B. subtilis*. Secuencia nucleotídica obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. Al compararla con la base de datos de NCBI, arrojó como mayor porcentaje de identidad de la bacteria *Bacillus subtilis*.

D

Bacillus mycooides

```
1 50
CAACGTCGAACGAATGGATTAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA
51 100
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGG
101 150
GAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAAATT
151 200
GAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCT
201 250
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG
251 300
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
301 350
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
351 400
CCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAA
401 450
GAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
451 500
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
501 550
CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGT
551 600
CTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA
601
GACTTGAGTGCAGAAGA
```

Figura D: Secuencia nucleotídica de *B. mycooides*. Secuencia nucleotídica obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. Al compararla con la base de datos de NCBI, arrojó como mayor porcentaje de identidad de la bacteria *Bacillus mycooides*.

E

Bacillus megaterium

```
1 50
AGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACC
51 100
GAAGCTAATAACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGA
101 150
TGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCC GCGGCTGCATTAGCTAGTTG
151 200
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCNACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT
201 250
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
251 300
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
301 350
TGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAC TCTGTTGTTAGGGAAGAACA
351 400
AGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
401 450
GGTCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTAT
451
CCGGA
```

Figura E: Secuencia nucleotídica de *B. megaterium*. Secuencia nucleotídica obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. Al compararla con la base de datos de NCBI, arrojó como mayor porcentaje de identidad de la bacteria *Bacillus megaterium*.

F

Bacillus mojavenis

```
1 50
GTCGAACGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT
51 100
GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
101 150
CGGGGCTAATAACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAG
151 200
GTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
201 250
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
251 300
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
301 350
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
351 400
TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
401 450
AGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGNACGGTACCTAACCAGAAAGCC
451 500
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
501 550
GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCCTTAAGTCTGAT
551
GTG
```

Figura F: Secuencia nucleotídica de *B. mojavenis*. Secuencia nucleotídica obtenida a partir de los amplicones de la región rRNA 16S. Al compararla con la base de datos de NCBI, arrojó como mayor porcentaje de identidad de la bacteria *Bacillus mojavenis*