

CARACTERIZACIÓN BACTERIOLÓGICA DEL MATERIAL PARTICULADO
PROVENIENTE DE UN AMBIENTE MARINO DE LA CIUDAD DE
CARTAGENA DE INDIAS – CARIBE COLOMBIANO.

YORELIS DEL CARMEN MARRUGO MEJIA
JANIA PAOLA URIBE CARO

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE BOLÍVAR
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AMBIENTAL
CARTAGENA DE INDIAS D.T y C

2017

CARACTERIZACIÓN BACTERIOLÓGICA DEL MATERIAL PARTICULADO
PROVENIENTE DE UN AMBIENTE MARINO DE LA CIUDAD DE CARTAGENA
DE INDIAS – CARIBE COLOMBIANO.

YORELIS DEL CARMEN MARRUGO MEJIA

JANIA PAOLA URIBE CARO

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA AMBIENTAL

DIRECTORAS

MARÍA ELENA HUERTAS BOLAÑOS, PhD.

ROSA LEONOR ACEVEDO BARRIOS, PhD(c).

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE BOLÍVAR
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AMBIENTAL
CARTAGENA DE INDIAS D.T y C

2017

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Cartagena de Indias D.T y C., 24 de febrero de 2017

Dedicatoria

Dedico este trabajo a los maravillosos ecosistemas, bellas especies que habitan nuestro mundo, convirtiéndolo en un paraíso que debemos proteger.

A Dios, por regalarme la vida y el lugar donde vivo.

A mi madre, Celia Mejía Arias por amarme y enseñarme el valor de la perseverancia.

A mi padre, Anastacio Marrugo García por enseñarme el valor del esfuerzo, dedicación y amor al estudio.

A mis hermanos por darme buenos consejos y protegerme.

A mi sobrino por ser mi motor para seguir adelante.

A Efrén Carrasquilla Zabaleta por apoyarme en los momentos y situaciones más difíciles.

A Gustavo, Brenda, Cristina, Karen, Edson y Edgar por sus sabios consejos y apoyo incondicional, más que amigos son mi familia.

A mis directoras de tesis María Huertas y Rosa Acevedo por aportar con su experiencia científica en mi formación académica, por sus consejos, paciencia y dedicación en todo el proceso de tesis.

Jania Uribe Caro gracias todo por tu amistad, por hacerme reír, por escucharme y sobre todo por tu apoyo incondicional. No es fácil trabajar en equipo pero tú y yo hicimos el mejor. Sin ti no hubiese sido fácil concluir con el desarrollo de esta tesis. Gracias por ser una gran mujer.

Yorelis Marrugo Mejía

A mi madre Rosiris.

Por ser el amor hecho mujer y ser la inspiración de mi vida.

A mi Padre Javier (QEPD).

Por enseñarme que el estudio es un privilegio.

A mi hermano Jean Carlos por forjar mi paciencia y responsabilidad; es una calilla.

Al señor Carlos Gedeón por brindarme no solo la oportunidad de realizar mis estudios superiores, sino también por sus consejos, la perseverancia inculcada y su apoyo incondicional.

A mis abuelos maternos por formar mi carácter.

A mi pequeño Bobba Fett por compartir su experiencia, su música, sus risas y también sus tristezas. Por enseñarme a querer en libertad y sobre todo por hablar en términos de igualdad.

A Elsy Caro y a Joaquín Leones por creer en mí desde siempre, por ser mi apoyo en tiempos difíciles.

A mis amigos. Luis Alejandro, Carlos Antonio, Cristina, Edgar B, Abraham, Melanys, Luis Alberto, Dary, Edgar O, Edson, Raúl, Edgar Sánchez, José, Whitney, José M, Jhoan y a Eddy por compartir alegrías, tristezas y ser mi familia.

A mis primitos Juan Sebastián, Juan José y Yadis por llenar mi vida de felicidad.

A María Elena por llegar en el momento indicado de mi vida, por ser mi amiga, por lo bruja y por compartir la experiencia de ser mujer.

A Melissa por permitirme ser parte de tu familia, por ser mi hermana y por tantas locuras compartidas.

A mis directoras de tesis María Huertas y Rosa Acevedo por compartir lo más importante de un ser humano, sus conocimientos.

Finalmente a Yorelis, por ser mi amiga y mi compañera de tesis. Has sido el motor de este estudio, gracias por tanto.

A todos mis más profundos y sinceros agradecimientos, en este punto sé que soy quien tiene la fortuna conocerlos.

Jania Paola Uribe Caro

AGRADECIMIENTOS

Esta es una tesis para aspirar al título de Ingeniera ambiental de la Universidad Tecnológica de Bolívar, departamento de Ingeniería civil y ambiental. Es un trabajo pionero guiado por la Dra. María Elena Huertas Bolaños y la candidata a Dra. Rosa Leonor Acevedo Barrios, quienes propusieron el protocolo para el muestreo de material particulado (PM10) y de aislamiento de bacterias en ambientes marinos código A10000271 Convocatoria Interna de 2016 de la Universidad Tecnológica de Bolívar (UTB).

Queremos expresar nuestra gratitud a nuestras directoras de tesis Rosa Acevedo Barrios y María Elena Huertas por la dedicación y el seguimiento continuo a este trabajo, a Edson Carrillo Torres, quien nos acompañó y colaboró en el muestreo durante su estancia en Colombia, a Edgar Ospino Rodelo por su constante colaboración en el laboratorio de biología de la UTB, al Establecimiento Público Ambiental de Cartagena (EPA Cartagena) por suministrar los equipos para el muestreo y finalmente a Leandro Niebles Puello quien elaboró el mapa de la ubicación de la Bocana estabilizadora de marea usando el software ArcGis 10.3.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN..... | 8 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 12 |
| 2.1. Generalidades..... | 12 |
| 2.2. Técnicas más usadas para la medición de material particulado..... | 15 |
| 2.2.1. Muestreadores activos..... | 15 |
| 2.2.2. Equipos inerciales..... | 17 |
| 2.2.3. Equipos de toma de muestra con filtro..... | 19 |
| 2.3. Bacterias..... | 20 |
| 2.4. Criterios de identificación microscópica y bioquímica para el aislamiento bacteriano..... | 22 |
| 2.4.1. Características microscópicas de las colonias..... | 22 |
| 2.4.2. Tinción de Gram..... | 23 |
| 2.4.3. Pruebas bioquímicas..... | 25 |
| 2.5. Perclorato..... | 27 |
| 3. ESTADO DEL ARTE..... | 29 |
| 3.1. Generalidades..... | 29 |
| 3.2. Bacterias presentes en el aire..... | 29 |
| 4. OBJETIVOS..... | 33 |
| 4.1. OBJETIVO GENERAL..... | 33 |
| 4.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 33 |
| 5. METODOLOGÍA..... | 34 |
| 5.1. Etapa I: Campaña de monitoreo de material particulado..... | 34 |
| 5.2. Etapa II: Aislamiento y caracterización de las bacterias presentes en el material particulado (PM10)..... | 38 |
| 5.2.1. Recolección de muestras..... | 38 |
| 5.2.2. Aislamiento de las cepas bacteriana a partir del material particulado..... | 40 |
| 5.2.3. Identificación microscópica..... | 41 |
| 5.2.4. Purificación bacterias aisladas..... | 41 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.5. Identificación bioquímica..... | 41 |
| 5.2.6. Conteo de colonias..... | 42 |
| 5.2.7. Pruebas de susceptibilidad..... | 43 |
| 5.3 Etapa III: Análisis de correlación de variables meteorológicas, concentración de PM10..... | 45 |
| 6. RESULTADOS..... | 46 |
| 6.1. Análisis bacteriológico..... | 46 |
| 6.2. Identificación bioquímica..... | 52 |
| 6.3. Conteo de colonias..... | 55 |
| 6.4. Pruebas de susceptibilidad..... | 55 |
| 6.4.1. Ensayos de susceptibilidad al NaCl. | 55 |
| 6.4.2. Ensayos de susceptibilidad al KClO₄..... | 57 |
| 6.5. Variables meteorológicas | 58 |
| 7. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS | 60 |
| 8. CONCLUSIÓN | 63 |
| 9. TRABAJO FUTURO | 64 |
| 10. BIBLIOGRAFIA | 65 |
| 11. ANEXOS | 73 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Comparación de tamaño (Cabello y Material Particulado)..... | 14 |
| Figura 2. Equipos de muestreo de material particulado (a) Hi Vol y (b). Low Vol .. | 16 |
| Figura 3. Impactador de cascada..... | 18 |
| Figura4. Frasco borboteador | 19 |
| Figura 5. Morfología y agrupación de distintas bacterias..... | 21 |
| Figura 6. Características de las colonias. | 23 |
| Figura7. (a) Bacillus Gram positiva y (b) Bacillus Gram negativa | 24 |
| Figura8.Pared celular bacteriana y su composición..... | 25 |
| Figura 9. BBL Crystal ID | 26 |
| Figura 10. Procedimiento para la identificación de bacterias con BBL Crystal | 27 |
| Figura 11. Ubicación del área de estudio..... | 35 |
| Figura 12. Instalación de los equipos de monitoreo de calidad de aire y estación meteorológica (BGI modelo PQ200) | 36 |
| Figura 13. Diagrama de flujo de la campaña de monitoreo | 37 |
| Figura 14. Filtros de película PTFE. (a) filtro sin muestra de material particulado y (b) filtro con muestra de material particulado | 38 |
| Figura 15. Diagrama de flujo del análisis bacteriológico | 39 |
| Figura16.Aislamiento de cepas bacterianas: (a) Siembra en caldo LB, (b) y (c) siembra en agar LB y d) cepas aisladas | 40 |
| Figura 17. Identificación bioquímica: (a).BBL Crystal™ Kit ID, (b) catalasa y (c) oxidasa | 41 |
| Figura 18. Conteo de colonia utilizando un LBX Zoom Stereo Microscope | 42 |
| Figura 19. Concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) | 43 |
| Figura 20. Concentraciones de perclorato de potasio (KClO ₄)..... | 44 |
| Figura 21. Rosa de vientos para el mes de agosto y septiembre 2015. | 58 |
| Figura 22. Relación entre variables meteorológicas (Agosto y Septiembre 2015), concentración de material particulado (PM ₁₀), y norma de calidad del aire en Colombia..... | 59 |
| Figura 23. Correlación lineal de variables meteorológicas y concentración para los meses de Agosto y Septiembre de 2015. | 60 |
| Figura 24.Ubicación de los equipos de monitoreo de calidad del aire en la Bocana | 74 |
| Figura 25. Ensayos de susceptibilidad al perclorato B12. Formación de biopelículas..... | 74 |
| Figura 26. Ensayos de susceptibilidad al perclorato | 75 |
| Figura 27.Morfología cepa b03, a través de LBX Zoom Stereo Microscope..... | 76 |
| Figura 28. Muestreo de material particulado en la bocana | 76 |
| Figura 29. Ensayos de análisis microbiológicos | 77 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Niveles máximos permisibles para PM10. | 14 |
| Tabla 2. Diferencia entre Gram positivas y Gram negativas | 24 |
| Tabla 3. Cálculos concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) | 44 |
| Tabla 4. Cálculos concentraciones de perclorato (KClO ₄) | 45 |
| Tabla 5. Aislamiento de bacterias en muestras de material particulado (PM10) provenientes de la Bocana, Cartagena de Indias | 46 |
| Tabla 6. Caracterización microscópica y bioquímica de las bacterias aisladas del Material particulado en la Bocana. | 48 |
| Tabla 7. Actividad bioquímica de bacterias Gram positivas aisladas en la Bocana, ambiente marino de la ciudad de Cartagena | 53 |
| Tabla 8. Actividad bioquímica de bacterias Gram negativas aisladas en la Bocana, ambiente marino de la ciudad de Cartagena | 54 |
| Tabla 9. Conteo de colonia por mililitro de solución..... | 55 |
| Tabla 10. Pruebas de susceptibilidad al cloruro de sodio de bacterias aisladas a partir del material particulado..... | 56 |
| Tabla 11. Pruebas de susceptibilidad al perclorato de bacterias aisladas a partir del material particulado..... | 57 |
| | |
| Ecuación 1. Calculo de unidades formadora de colonia por mililitro de solución. ... | 42 |

RESUMEN

Los microorganismos presentes en el aire en zonas costeras han sido estudiados en diversas partes del mundo; sin embargo, la presencia de bacterias en el aire depende de condiciones particulares del lugar en el cual sean estudiadas. Para el caso de Cartagena de Indias, no se tiene un conocimiento amplio de cuáles son las bacterias ambientales presentes en el aire y cuál es la calidad microbiológica en ese ambiente. Es por ello que, esta investigación caracterizó bacteriológicamente el material particulado menor o igual a $10\mu\text{m}$ (PM10) en un ambiente marino (playa la Bocana) y se determinó la relación que existe entre la concentración de material particulado, parámetros meteorológicos. Dentro de los microorganismos se encontraron bacterias propias de ambientes marinos, tales como: *Bacillus marisflavis* (68 UFC/mL), *Bacillus flexus* (9 UFC/mL), *Bacillus cohnii* (9 UFC/mL), *Bacillus sp* (22 UFC/mL) y *Bacillus spp*. Como resultados se encontraron que la norma de calidad del aire para PM10 ($100\ \mu\text{g}/\text{m}^3$) fue excedida en 3 de los días durante el periodo de muestreo y las condiciones meteorológicas no parecieron ser la razón que explique este fenómeno ($r < 0.3$).

Palabras claves: microorganismos, material particulado, bioaerosoles, parámetros meteorológicos.

ABSTRACT

The microorganisms present in the air in coastal zones have been studied in various parts of the world; however, the presence of bacteria in the air depends on the particular conditions of the place where they are studied. For the case of Cartagena de Indias, there is not a broad knowledge of the bacteria present in the air and the microbiological quality in that environment. That is why this research carried out both, a bacteriological characterization of the particulate matter smaller than equal to 10µm (PM10) in a marine environment (La Bocana beach) and the determination of the relationship among particulate matter, meteorological parameters. Within the microorganisms, bacteria proper of marine environments were found, such as: *Bacillus marisflavis* (68 UFC/mL), *Bacillus flexus* (9 UFC/mL), *Bacillus cohnii* (9 UFC/mL), *Bacillus sp* (22 UFC/mL) and *Bacillus spp*. As a result, it was found that the air quality standard for PM10 (100 µg/m³) was exceeded in 3 of the days during the sampling period and the meteorological conditions did not appear to be the reason to explain this phenomenon ($r < 0.3$).

Keywords: microorganisms, particulate matter, bioaerosols, meteorological variables.

1. INTRODUCCIÓN

Las emisiones de material biológico particulado, más conocidas como bioaerosoles, son partículas transportadas por el aire y se encuentran presentes en la atmósfera en forma de bacterias, polen, hongos, virus, entre otros (Douwes et al.,2003). La atmósfera no es considerada el hábitat usual de los microorganismos; sin embargo, algunos de ellos pueden reproducirse en este medio (Dimmick et al.,1979). La presencia de bacterias en el aire es el producto de actividades antropogénicas generadoras de aerosoles biológicos, que se convierten en vehículos transmisores de patógenos a humanos y a animales. Actividades como tráfico vehicular, centros de manejo de residuos, prácticas agrícolas, entre otras, liberan gran cantidad de bacterias a la atmósfera, produciendo contaminación en áreas circundantes (Hughes, 2003). Además, estas bacterias aerotransportadas en altas concentraciones afecta el estado de salud de las personas que respiran este aire (García et al.,2016).

En consecuencia, se han hecho muchos estudios sobre la composición química del material particulado, pero los estudios de caracterización bacteriológica son escasos (Adhikari et al.,2006; Alexis et al.,2006; Mueller et al.,2004; Degobbi et al.,2011). Debido a esto, no ha sido posible determinar con claridad las asociaciones existentes entre las bacterias presentes en el aire y la calidad del aire en espacios abiertos (ambiente marino). Esto incide en que, por ejemplo, en Colombia se carece de normatividad sobre concentraciones de bioaerosoles en ambientes *outdoor* e *indoor*. Por esta razón, esta investigación tiene como objetivo caracterizar bacteriológicamente muestras de material particulado recogidas en un ambiente marino de la ciudad de Cartagena, teniendo en cuenta su concentración y los parámetros meteorológicos.

Para la identificación de las bacterias presentes en el material particulado (PM10), se ejecutaron dos etapas. La primera consistió en una campaña de monitoreo para recolectar las muestras de PM10 en la Bocana (10°27'10,5" N - 75°30'27,9" W). En la segunda etapa, se realizó el aislamiento y caracterización de las bacterias presentes en las muestras analizadas de material particulado. El crecimiento de las cepas bacterianas fue llevado a cabo en medio LB modificado con agua de mar.

Las muestras de material particulado fueron recolectadas por filtración con dos muestreadores de bajo volumen (BGI modelo PQ200 de caudal constante de 16.7 L/min) suministrados por el EPA Cartagena. Uno de los equipos se usó para medir la concentración de PM10, mientras que el otro para la caracterización

bacteriológica de PM10. Las muestras se tomaron de forma simultánea por un periodo de 24 horas durante 2 meses (agosto-septiembre) del 2015. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Biología de la Universidad Tecnológica de Bolívar para su procesamiento.

En total se tomaron 30 muestras de las cuales fueron viables 12. Se inhibió el crecimiento de hongos utilizando el antibiótico fluconazol. La identificación microscópica de las bacterias se realizó mediante tinción de Gram para bacterias Gram positivas y Gram negativas. Luego de obtener el resultado de la tinción de Gram, se procedió a realizar la identificación bioquímica de las bacterias aisladas empleando el sistema de identificación *BBL Crysta™*. Además, se realizó la prueba de oxidasa, catalasa y conteo de unidades formadoras de colonias utilizando *LBX Zoom Stereo Microscope*. Finalmente, se realizó la prueba de susceptibilidad al cloruro de sodio (NaCl) y perclorato de potasio (KClO₄) a los géneros de bacterias identificadas.

Los resultados obtenidos indicaron que durante 3 días fue excedida la norma de calidad del aire Tabla 1, con una concentración máxima de 180 µg/m³. Las variables meteorológicas como temperatura y humedad presentaron una media de 29.5 °C y 78%, respectivamente. La velocidad del viento predominante fue de 2 m/s y la dirección noreste. Por medio del coeficiente de correlación (r) se estableció que no existe correlación lineal entre la concentración del material particulado y las variables meteorológicas ($r < 0.3$), lo cual indica que, posiblemente, no son los fenómenos meteorológicos los responsables de las altas concentraciones que se presentaron en algunos días durante el periodo de muestreo. En términos microbiológicos, se determinó que de las muestras analizadas un 92% correspondieron a bacterias Gram Positivas y solo un 8% a bacterias Gram Negativas. Además, se identificó un género bacteriano *Bacillus* y se determinaron las siguientes especies: *Bacillus marisflavis* (68 UFC/mL), *Bacillus flexus* (9 UFC/mL), *Bacillus cohnii* (9 UFC/mL), *Bacillus sp* (22 UFC/mL), y *Bacillus spp*. Estas bacterias presentaron alta tolerancia a concentraciones de cloruro de sodio (50.000 a 300.000 ppm) y al perclorato de potasio en concentraciones de 250 ppm hasta 1250 ppm.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades

La atmósfera es la envoltura gaseosa que rodea la Tierra (MAVDT, 2010). Se encuentra conformada por varios estratos (partiendo desde la superficie del suelo): troposfera, estratosfera, mesosfera y termosfera (Quevedo, 2005).

Los compuestos más abundantes de la atmósfera seca son el nitrógeno y el oxígeno, con un coeficiente de mezcla volumétrico de 78.1% y 20.9%, respectivamente. Así mismo, existen gases traza como el argón, el helio y ciertos gases de efecto invernadero radiativamente activos como el dióxido de carbono (0,035%) y el ozono. Además, la atmósfera contiene vapor de agua, que es también un gas de efecto invernadero en cantidades muy variables. Por lo general, con un coeficiente de mezcla volumétrico de 1% (IPCC, 2013). La atmósfera contiene también nubes y aerosoles.

Una característica importante de la atmósfera es que sirve como medio de dispersión de muchos organismos, como lo son: las esporas, bacterias, virus y hongos. La atmósfera no tiene una microbiota autóctona (De La Rosa et al., 2002), esto se debe a que las variables físicas y químicas de la atmósfera no favorecen el crecimiento microbiano.

La temperatura disminuye al aumentar la altitud de la troposfera. En la parte superior de ésta, las temperaturas oscilan entre -43°C y -83°C, muy por debajo de la temperatura mínima de crecimiento que toleran los microorganismos. Al aumentar la altitud, la presión atmosférica disminuye y la concentración de oxígeno disponible se reduce hasta un punto en el que es imposible la respiración aeróbica (Atlas & Bartha, 2002).

En la capa más baja de la atmósfera, la troposfera puede proporcionar hábitat temporales para los microorganismos. En las nubes hay concentraciones de agua que permiten su crecimiento. La intensidad lumínica y la concentración de dióxido de carbono de las nubes son suficientes para favorecer el crecimiento de microorganismos fotoautótrofos y los núcleos de condensación suministran algunos nutrientes minerales (Atlas y Bartha, 2002). En el aire se aíslan frecuentemente bacterias esporuladas de los géneros *Bacillus*, *Clostridium* y *Actinomicetos* (Underwood, 1997; Atlas y Bartha, 2002).

En la troposfera, se encuentra concentrada el 75% de la atmósfera. En esta zona, encontramos el material particulado PM el cual, hace referencia a una mezcla compleja de contaminantes, polvo, humo y partículas en estado sólido o líquido que se encuentran suspendidas y dispersas en el aire (Sbarato et al., 2000); entre ellas los bioaerosoles (Balasubramanian et al.,2003; Degobbi et al.,2011).

El material particulado, comúnmente, es usado como indicador de contaminación. Además, hace parte de los contaminantes criterios, es decir, aquellos que deben ser regulados por la autoridad ambiental, puesto que pueden ocasionar daños en la salud de los seres vivos, en el ambiente o causar daño a la propiedad (MAVDT, 2010).

De acuerdo a su diámetro aerodinámico, pueden agruparse en partículas finas y gruesas. Las partículas finas tienen un diámetro aerodinámico menor o igual a $2,5\mu\text{m}$ (PM_{2.5}). Las partículas gruesas son aquellas que tienen un diámetro aerodinámico mayor a $2,5\mu\text{m}$ y menor o igual a $10\mu\text{m}$ (PM₁₀). Por último, están las Partículas Totales en Suspensión (TSP, por sus siglas en inglés) (Sbarato et al., 2000). Las partículas pueden provenir de erupciones volcánicas, de la erosión de las montañas, edificios, construcciones, vías sin pavimentar, chimeneas, incendios (US EPA, 2016), plantas como granos de polen, o ser en sí mismas, bacterias, hongos o virus (Rojas, 2005).

Las partículas con diámetro aerodinámico inferior o igual a 10 micrómetros, son partículas tan pequeñas que pueden llegar a los pulmones, causando graves problemas de salud. Para dimensionar el tamaño de estas partículas, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, por sus siglas en inglés) ha comparado el tamaño de ellas con el de un cabello humano, tal como se muestra en la Figura 1.

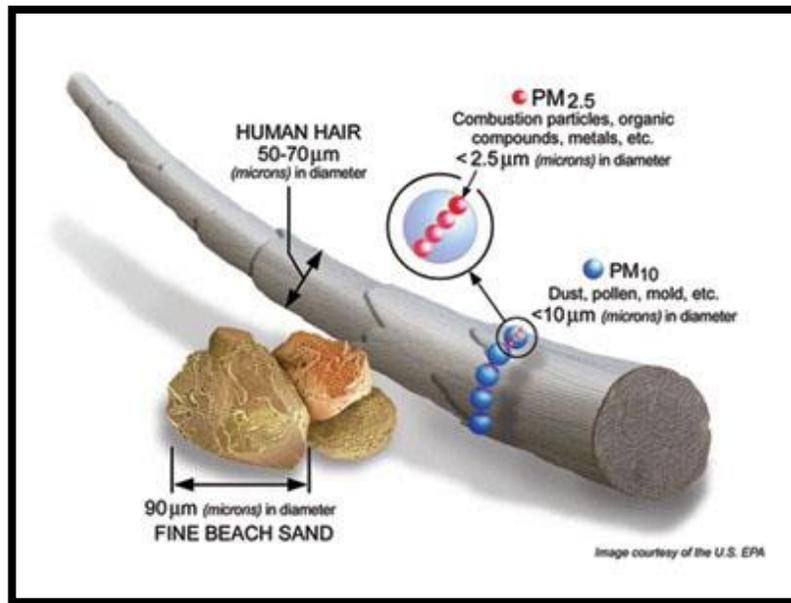


Figura 1. Comparación de tamaño (Cabello y Material Particulado)
Fuente: US EPA (2016)

Como se mencionó anteriormente, el material particulado es un contaminante criterio y debe estar regulado por las autoridades ambientales. En Colombia los niveles máximos permisibles fueron establecidos por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial a través de la Resolución 0610 de 2010 por la cual se establece la Norma de Calidad del Aire o Nivel de Inmisión (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles máximos permisibles para PM10.

| Contaminante criterio | Tiempo de exposición | Nivel máximo permisible ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) |
|-----------------------|----------------------|------------------------------------------------------|
| PM10 | Anual | 50 |
| | 24 horas | 100 |

Para la medición estándar de material particulado existen dos métodos comúnmente utilizados:

1. Gravimetría: es el método de referencia para determinar la masa de partículas PM10 y PM2.5 presentes en un flujo de aire (Sbarato et al., 2000; US EPA, 2016; Gobierno de Aragón, 2017), con una variedad de equipamiento homologados por la US EPA. Este método consiste en realizar un muestreo de aire ambiente durante un periodo de 24 horas con un caudal de flujo constante, el cual se hace pasar por un filtro, donde queda retenido el material particulado. La concentración del PM se obtiene restando el peso inicial (filtro sin muestra) con el peso final (filtro con muestra), esto dividido por el volumen total del muestreo.
2. Atenuación de radiación Beta: es un método de medición continua alterno. Aquí el equipo muestreador contiene una fuente de radiación beta que determina la ganancia de peso en un filtro a medida que este experimenta acumulación de partículas (Carnicer, 2007; Velasco, 2015).

2.2. Técnicas más usadas para la medición de material particulado

2.2.1. Muestreadores activos

Según el Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial – MAVDT, los muestreadores activos toman un volumen de aire conocido que es bombeado a través de un colector (un filtro en el caso de las partículas o una solución química para los gases), por un periodo de tiempo determinado. En estos muestreadores, se conoce el volumen real de la muestra del contaminante y se requiere de un procesamiento posterior de la muestra. Por otra parte, los sistemas semiautomáticos, como los muestreadores de PM10 y SO₂, son adecuados para mediciones de estándares diarios y anuales (MAVDT, 2010). Dentro de los muestreadores activos se tiene:

- Equipos de bajo volumen o LowVol (*Low Volumen Sampler*).

Son equipos que funcionan con flujos entre 1 y 25 litros por minuto (Figura 2). Hacen pasar aire a través de un filtro de tamaño de poro de 47 mm durante un periodo de 24 horas. El filtro es pesado antes y después para determinar el peso neto ganado. El volumen total de aire muestreado se determina a

partir de la velocidad promedio de flujo y el tiempo de muestreo (Wang et al., 2005; MAVDT, 2010). La concentración total de partículas en el aire ambiente se calcula como la masa recolectada dividida por el volumen de aire muestreado (Salminen y Karlsson, 2003).

- Equipos de alto volumen o Hi Vol (*High Volumen Sampler*)
Un muestreador de alto volumen es un equipo que succiona una cantidad medible de aire ambiente hacia una caja de muestreo a través de un filtro durante un periodo de tiempo conocido, generalmente 24 horas (Figura 2).

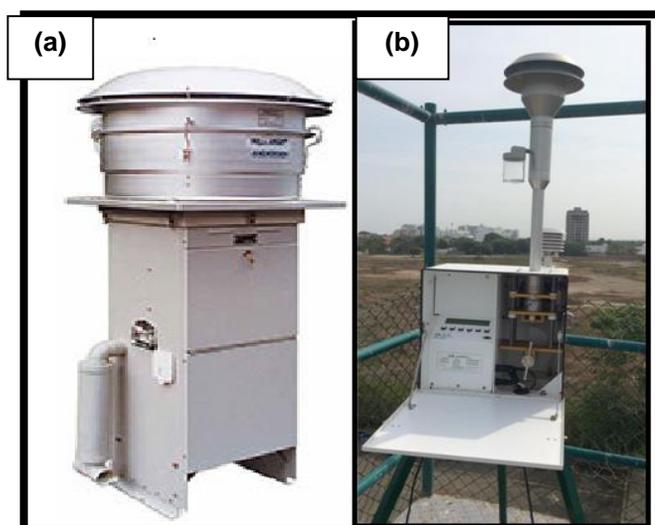


Figura 2. Equipos de muestreo de material particulado (a) Hi Vol y (b). Low Vol
Fuente: autoría propia

Los equipos usados en este estudio tienen un sistema de bombeo que obliga a una corriente de aire con caudal de 16,7 L/min a pasar por un sistema de retención. Este sistema de retención es un filtro de membrana.

El *Intergovernmental Panel on Climate Change* definen aerosol como el conjunto de partículas sólidas o líquidas suspendidas en el aire, con diámetros que varían de algunos nanómetros (10^{-9}) a 10 micrómetros de diámetro (IPCC, 2013). Los aerosoles pueden ser de origen natural o antropogénicas. La niebla, la bruma, el humo, el polvo, la ceniza volcánica fina, las nubes, las nubes de cenizas, el aire salado del mar, todos son aerosoles (Hinds, 1999; Quevedo, 2005).

Cuando se habla de bioaerosoles, se hace referencia a todas las partículas aerotransportadas de origen biológico: bacterias, hongos, esporas de hongos, virus,

polen y sus fragmentos, incluyendo antígenos (Kalogerakis et al., 2005), los cuales pueden unirse al material particulado (Degobbi et al., 2011).

El tamaño de las partículas de los bioaerosoles puede variar en un rango de diámetro aerodinámico de 0,5 a 100 μm (Nevalainen et al., 1992; Cox y Wathes, 1995). Las bacterias, por ejemplo, tienen diámetros típicos de 0.28 a 8 μm (Jones y Harrison, 2004).

Los microorganismos pueden ser transportados rápidamente en forma de bioaerosoles a través de grandes distancias con el movimiento del aire que presenta el mejor camino de dispersión (De La Rosa et al., 2002), afectando no solo la calidad de vida, sino también la visibilidad y el clima (Douwes et al., 2003). Sin embargo, la dispersión y la supervivencia de los bioaerosoles en el aire dependen de las condiciones a las que estén expuestas: velocidad del viento, dirección, humedad, temperatura, etc. (Colls, 2002).

La mayoría de los dispositivos que se usan para el muestreo de aerosoles implican técnicas que separan las partículas de la corriente de aire y son depositados en o sobre un medio líquido o sólido (Jensen et al., 1994). Con base a lo anterior, los equipos se clasifican en:

2.2.2. Equipos inerciales

En estos equipos, el flujo de aire que entra por la boquilla del dispositivo cambia de dirección y las partículas contenidas en ella con suficiente inercia son separadas del flujo impactando sobre una superficie (INSHT, 2001). Existen varios equipos que funcionan con este principio, tales como: muestreador de rendija, impactador de cascada, muestreador multiorificio, frascos borboteadores, ciclones lavadores y muestreador centrífugo de *Reuter* o RCS. Sin embargo, solo se mencionarán los más relevantes.

- Muestreador de rendija.

En este equipo el aire ingresa a través de una o cuatro rendijas con flujos de aire de 30L/min y 700L/min (según el modelo) y es impulsado sobre una superficie de impactación: una caja Petri con medio de cultivo, un portaobjetos o una cinta adherente (Guardino, 2009). La superficie de impactación depende del objetivo del muestreo (observación directa al

microscopio de las partículas, identificación de especies microbianas, conteo de colonias, entre otras).

- Muestreador Andersen o impactador de cascada.

Dentro de los equipos inerciales, el muestreador Andersen es el más utilizado en los estudios de bioaerosoles (De La Rosa et al., 2002). Está constituido, usualmente, por una serie de seis placas de aluminio, perforadas cada una con 400 orificios que van disminuyendo su tamaño al bajar el nivel; por lo que la velocidad del aire se incrementa de una etapa a otra. Las cajas de Petri con medio de cultivo (sólido) se colocan debajo de cada una de las etapas como se muestra en la Figura 3.

Existe una versión del impactador de cascada de dos etapas, cada una con 200 orificios. Pero, al igual que el de seis etapas, succiona un flujo de aire de 28.3 L/min por medio de una bomba de vacío (Rosas et al., 2004).

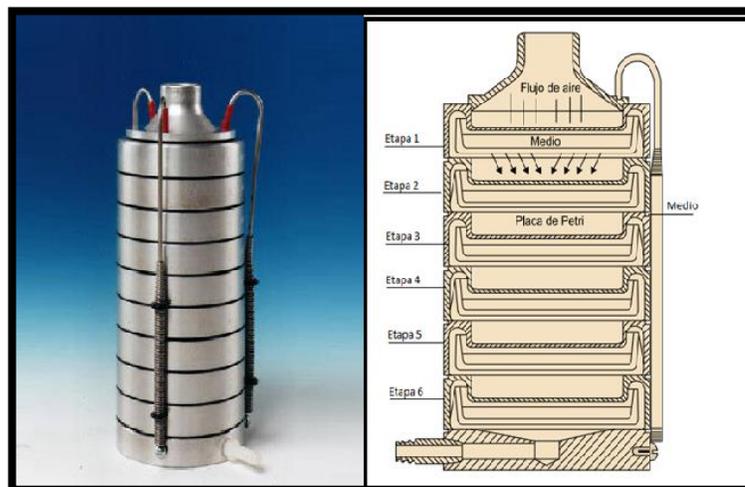


Figura 3. Impactador de cascada
Fuente: Guardino (2009)

- Frascos borboteadores o impactadores en líquido.

Los frascos borboteadores o *impingers* son equipos que funcionan conduciendo una corriente de aire al interior de un frasco que contiene un medio de captación líquido, como se observa en la Figura 4 (Guardino, 2009). Este equipo funciona con un flujo de aire de 12.5 L/min y, normalmente se

usan de 15 mL y 20 mL de medio de colecta (Rosas et al., 2004; Guardino, 2009).

Siguiendo los principios de la impactación inercial ayudada por la dispersión de las partículas en las burbujas formadas en la zona de impactación, las partículas son transferidas al medio líquido. Frecuentemente se utiliza agua destilada, soluciones salinas tamponadas o medios de cultivo diluidos para evitar problemas se les suele añadir un antiespumante (INSHT, 2001).

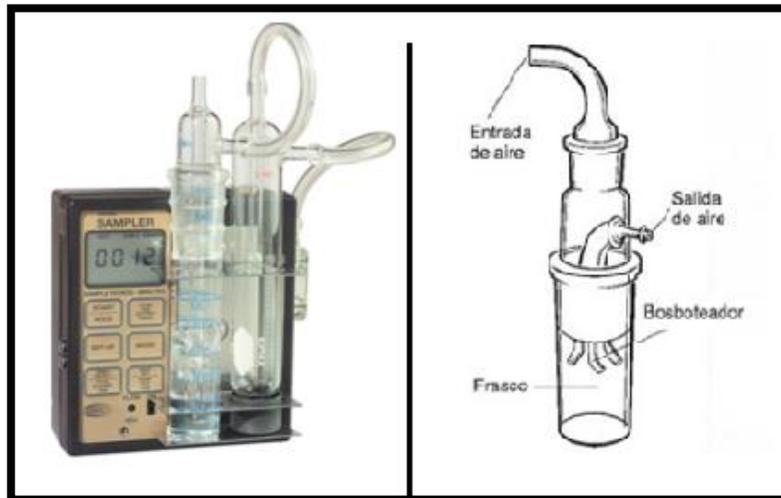


Figura4. Frasco borboteador
Fuente: INSHT (2001).

La desventaja de este equipo es que la cantidad de líquido puede reducirse por efecto de la evaporación, modificando la concentración de sales que puede afectar la supervivencia de los microorganismos (Henningson y Ahlberg, 1994)

2.2.3. Equipos de toma de muestra con filtro

El proceso de filtración se presenta cuando las partículas suspendidas en el aire son retenidas en un material poroso (Guardino, 2009). Existen filtros capilares, hechos de una fina capa de policarbonato. La eficacia de captación de estos filtros es baja para partículas de tamaño inferior al poro y aumenta para partículas menores a un micrómetro ($1\mu\text{m}$). Así mismo, hay filtros de membrana que, por tener una microestructura compleja, tienen una eficacia elevada, incluso para partículas inferiores a las del poro (Griffiths y DeCosemo, 1994; INSHT, 2001; Guardino,

2009). Para la captación de bioaerosoles, los filtros de membrana más usados son los esteres de celulosa.

En general la captación de una partícula depende de:

- Su diámetro aerodinámico.
- El tamaño del poro del filtro.
- El caudal de aire que atraviesa el filtro.

De acuerdo a las características anteriores se pueden diferenciar cuatro principios de captación de partículas:

- Tamizado.
- Interceptación.
- Impactación.
- Difusión

Como cualquier sistema de muestreo, la determinación del caudal de aire y el tiempo de muestreo basado en las normas de concentración existentes son parámetros fundamentales para obtener muestras útiles para el análisis.

2.3. Bacterias

La Aerobiología es la ciencia que estudia los microorganismos del aire desde todos sus aspectos: identidad, comportamiento, movimientos y supervivencia, así como sus implicaciones con otros microorganismos, el hombre, los animales y la vegetación (De La Rosa et al., 2002).

Esta ciencia está principalmente interesada en la fuente de aire, dispersión e impacto. Además, su interés incluye los factores ambientales que afectan a la toma de fuerza y la deposición (Tormo, 2009).

La presencia de microorganismos en el aire depende de las condiciones particulares del lugar en el cual sean estudiadas. Entre los microorganismos presentes en el aire se encuentran las bacterias. Las bacterias son microorganismos procariotas, solo tienen un cromosomas único (nucleoide) que no está encerrado en la membrana nuclear. La pared celular contiene peptidoglucano, lípidos y proteínas (Tortora et al., 2007).

Las células bacterianas tienen una gran variedad de formas y tamaños, típicamente tienen un diámetro con un rango entre 0,25 y 8 μm (Jones y Harrison, 2004). Algunas de las morfologías básicas son: células esféricas (cocos), células en forma de bastón (bacilos), células en forma de espiral (espirilos) y células en forma de coma (vibrios) (Figura 5) (Koneman y Allen, 2008). Además, cuando las células bacterianas permanecen unidas entre sí forman agrupaciones en forma de cadenas o racimos, las cuales son: Diplo (de dos células), Strepto (cadena de más de dos células), Estafilo (agrupación en forma de racimo) y en ocasiones pueden agruparse de forma irregular entre otros.

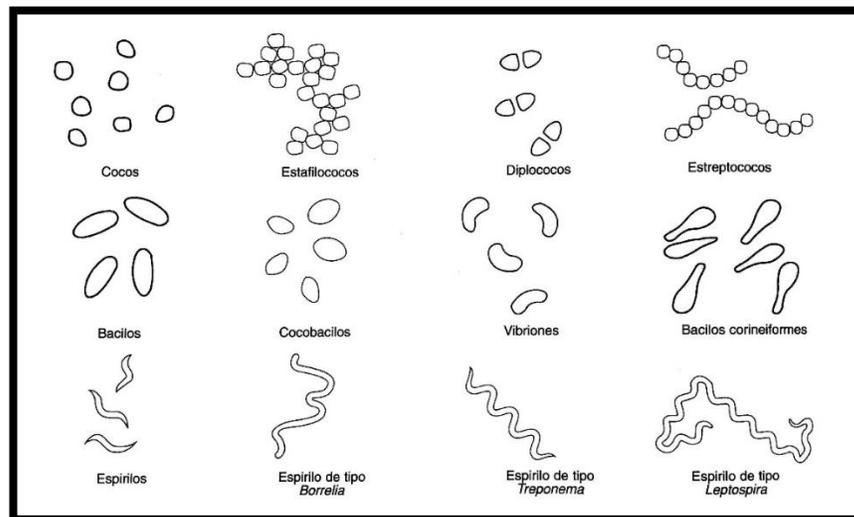


Figura 5. Morfología y agrupación de distintas bacterias
Fuente: Koneman y Allen (2008).

Los microorganismos que viven en hábitats caracterizados por la alta salinidad (NaCl 2 - 5M), la alta alcalinidad (pH mayor de 8) o alta acidez (pH menor de 4), las altas temperaturas (55 - 121°C), las bajas temperaturas (-2 - 20°C) o la alta presión se les conoce como bacterias extremófilas (Madigan y Marrs, 1997; Rothschild y Manicini, 2001; Freeman, 2009).

El mar es un cuerpo de agua que cubre un 71% de la superficie del planeta configurando la mayor parte de la hidrosfera (Quevedo, 2005). La salinidad oscila entre 34.000 a 36.000 partes por millón (ppm) y varía de un lugar a otro. Sin embargo, hay muchos compuestos químicos que la hacen salada, pero el principal químico es el cloruro de sodio (NaCl) (Anderson, 2003; Science Learning Hub, 2010).

Los microorganismos que toleran o necesitan NaCl se pueden clasificar en halotolerantes (toleran elevadas concentraciones de cloruro de sodio pero no la requieren), halófilos moderados (suelen ser bacterias marinas que viven en

concentraciones de cloruro de sodio igual a 0,5 M), halófilos extremos o hiperhalófilos, los cuales requieren concentraciones saturantes de sales, 4 a 7 M de NaCl (Apella y Araujo, 2005). Aquellos microorganismos capaces de competir exitosamente en los medios salinos y resistir los efectos desnaturalizados del NaCl (Atlas y Bartha, 2002; González y Peña, 2002) son una clase interesante, debido a que cuentan con estrategias que les permiten enfrentar al estrés osmótico: mantienen altas concentraciones intracelulares de sal y sintetizan solutos compatibles que les permiten balancear su presión osmótica (Ramírez et al., 2004).

2.4. Criterios de identificación microscópica y bioquímica para el aislamiento bacteriano.

A continuación, se hace una breve descripción de los criterios de identificación microscópica y bioquímica para el aislamiento e identificación de las bacterias presentes en el material particulado (PM10) provenientes de un ambiente marino de la ciudad de Cartagena de Indias.

2.4.1. Características microscópicas de las colonias.

La determinación de las características generales de las colonias suele realizarse a través de la inspección de la superficie de la placa de agar. La Figura 6 contiene términos e ilustraciones útiles para la descripción de las colonias bacterianas (Koneman y Allen, 2008).

| | | | | |
|-----------|-------------|--|-------------|--|
| Forma | Puntiforme | | Irregular | |
| | Circular | | Rizoide | |
| | Filamentosa | | Aguja | |
| Elevación | Plana | | Pulvinada | |
| | Elevada | | Umbonada | |
| | Convexa | | Umbilicada | |
| Margen | Entero | | Lacerado | |
| | Ondulado | | Filamentosa | |
| | Lobulado | | Enrullada | |

Figura 6. Características de las colonias.
Fuente: Koneman y Allen (2008).

2.4.2. Tinción de Gram.

Descubierta por el bacteriólogo Hans Christian Gram, suele utilizarse para el examen directo por microscopia de las muestras y los subcultivos. La tinción emplea 4 reactivos diferentes: el cristal violeta es el colorante principal, se une a la pared bacteriana y su función principal es dar color a todas las células; el yodo de Gram (lugol), es el colorante mordiente, sirve para intensificar el color en la tinción; alcohol acetona, es el agente decolorante (Roger y Stanier, 1996; Bernadette, 2005). Un agente decolorante, puede o no remover el colorante primario de la célula entera o solo de ciertas estructuras celulares; y fucsina, un colorante contraste. Si después de la decoloración el colorante primario ha sido lavado, los componentes decolorados de la célula tomarán el color del colorante de contraste (López et al., 2004). Solo las células Gram negativas, que se decoloran, absorben el color rosado del colorante; mientras que, las células Gram positivas retienen el color violeta del colorante (Koneman y Allen, 2008; Jiménez y Vélez, 2012). En la Figura 7 observamos un ejemplo de *Bacillus* Gram positivas y *Bacillus* Gram negativas.

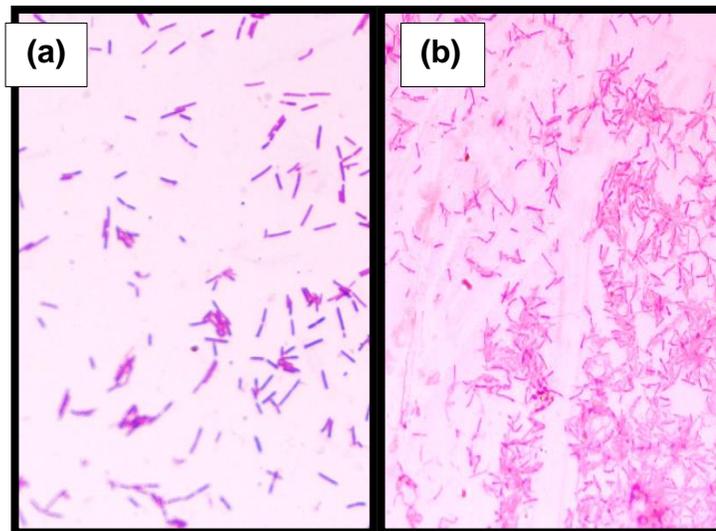


Figura7. (a) Bacillus Gram positiva y (b) Bacillus Gram negativa
Fuente: autoría propia

Las principales diferencias entre las células Gram positiva y Gram negativa se aprecian en la Tabla 2 y en la Figura 8.

Tabla 2. Diferencia entre Gram positivas y Gram negativas

| Gram positiva | Gram negativa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Retienen el colorante básico (cristal violeta) y se tiñen de color violeta. | Retienen el colorante contraste (fucsina) y se tiñen de color rosado. |
| Tienen una membrana plasmática rodeada por una pared celular con abundante peptidoglucano (Freeman, 2009). | Tienen una membrana plasmática rodeada por una pared celular que tiene dos componentes: una delgada capa gelatinosa que contiene peptidoglucano y una capa doble exterior de fosfolípidos (Freeman, 2009). |
| Pared celular grande (80%-90% de peptidoglucano). Está compuesta por varias capas de peptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida Figura 9(a) (Tortora et al., 2007). | Pared celular pequeña (capa de peptidoglucano fina 10%- 20%). Está compuesta por una o por muy pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa Figura 9(b).El hecho de que contengan una escasa cantidad de peptidoglucano aumenta su |

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| | susceptibilidad a la ruptura mecánica (Tortora et al., 2007). |
| No tiene capa de lipopolisacáridos. | Tiene capa externa de lipopolisacáridos. |

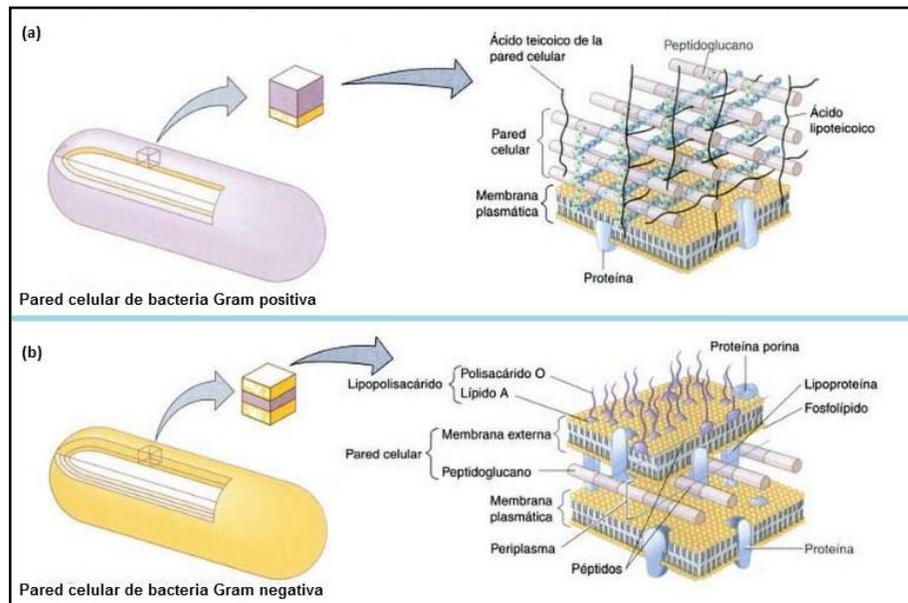


Figura8. Pared celular bacteriana y su composición
Fuente: Tortora et al., (2007)

2.4.3. Pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas realizadas comúnmente son:

- Prueba de Oxidasa: la prueba de citocromo oxidasa es de utilidad para la categorización inicial de muchas especies bacterianas que tienen diferentes morfología de colonias. Para realizar esta prueba, el reactivo (reactivo de Kovacs) se adiciona a una tira o disco de papel filtro colocando sobre una placa de Petri limpia y se extiende una alícuota generosa de microorganismo. El cambio de color en la tira indica que la prueba es positiva (Koneman y Allen, 2008; Rojas, 2011).
- Prueba de catalasa: es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_{2(g)}$). La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una prueba positiva. La mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas

poseen actividad catalasa, salvo los Estreptococos (Amaya y Gutiérrez, 2004).

- BBL Crystal™: son modificaciones de métodos clásicos, incluyendo pruebas para la fermentación, la oxidación, la degradación y la hidrólisis de varios sustratos. El *BBL Crystal™* es un sistema de identificación de bacterias Gram positivas (*BBL™ Crystal™ Gram-Positive ID Kit*) y Gram negativas (*BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit*) a través de sustratos convencionales, tales como: fluorogénicos y cromogénicos. El sustrato fluorogénicos es una molécula sobre la que actúa una enzima y, en este caso, el sustrato tendrá propiedades fluorescentes (Magyar, 2016). Los medios cromogénicos proporcionan un método rápido y preciso de aislamiento enumeración de microorganismos. Con base en la detección de actividades enzimáticas específicas; reduce la necesidad de realizar pruebas de confirmación (Alonso y Poveda, 2008).

El panel *BBL Crystal* (Figura 9) tiene sustratos ligados a cromógenos y fluorogénicos que sirven para la detección de las enzimas utilizadas por los microorganismos para metabolizar varios sustratos (*BBL Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit*).

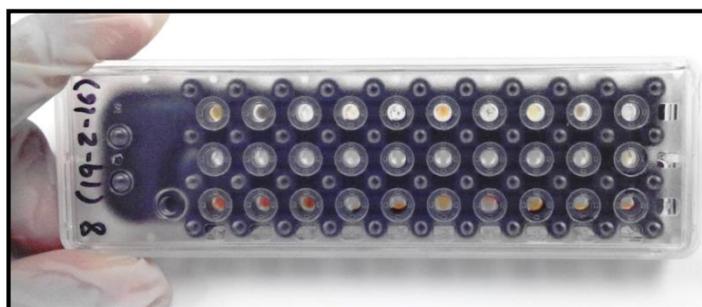


Figura 9. BBL Crystal ID
Fuente: autoría propia

El panel *BBL Crystal* contiene 29 sustratos enzimáticos y bioquímicos deshidratados y un control fluorescente en las puntas de las púas de plástico en su tapa, 30 pocillos para las reacciones en la base y tubos de *BBL Crystal* de fluido inóculo. El procedimiento para utilizar este método es el siguiente: el inóculo de la prueba se prepara con el fluido inóculo y con él se llenan los 30 pocillos en la base. Cuando la tapa se alinea con la base y luego se cierra, el inóculo de la prueba rehidrata los sustratos secos e inician las reacciones de las pruebas, como se observa en la Figura 10.

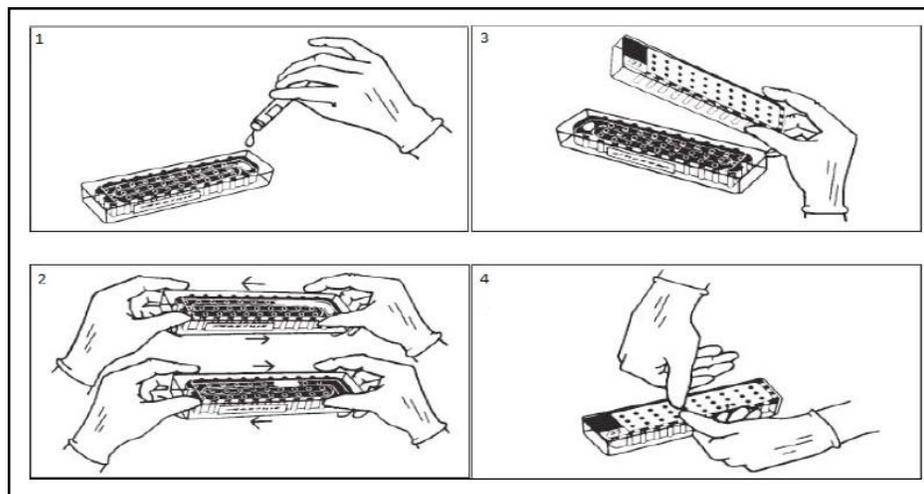


Figura 10. Procedimiento para la identificación de bacterias con BBL Crystal
Fuente: (BBL Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit).

Después de un período de incubación, se examinan los pocillos para determinar cambios de color o presencia de fluorescencia que resultan de las actividades metabólicas de los microorganismos. La serie de colores resultante de las 29 reacciones se convierte en un número de perfil de diez dígitos que se utiliza como la base de identificación. Las series de reacciones bioquímicas y enzimáticas de los 29 substratos *BBL Crystal* para una gran variedad de microorganismos están almacenadas en la base de datos *BBL Crystal*. La identificación se deriva de un análisis comparativo entre las series de reacciones del aislado de la prueba y las de la base de datos de la lista de grupos taxonómicos.

2.5. Perclorato.

El perclorato (ClO_4^-) es un anión inorgánico altamente oxidante (Oren et al., 2014; Murray y Bolger, 2014). Se encuentra normalmente en forma de ácido perclórico y sales como perclorato de amonio, perclorato de potasio y perclorato de sodio (Ryu et al., 2012). El perclorato se conoce como un contaminante persistente y difundido en los ecosistemas (Fisher et al, 2000; Motzer, 2001; Agudelo y Castro, 2015) permaneciendo estable durante largos períodos de tiempo bajo condiciones ambientales típicas (Ellington y Evans, 2000; Urbansky et al., 2001; Agudelo y Castro, 2015).

En las industrias química, aeroespacial y de defensa, el perclorato se utiliza en la fabricación de propulsores, explosivos y dispositivos pirotécnicos (Wallace et al., 1996). Puede estar presente en: el suelo, las aguas subterráneas (Ryu et al., 2012), depósitos de agua potable en muchos estados y, recientemente, en cultivos como la lechuga (Hogue, 2003; Waller et al., 2004) e incluso en la leche (Kirk et al., 2003; Waller et al., 2004).

El perclorato no es sólo tolerado por procariontas halófilos, algunos microorganismos incluso lo utilizan como aceptor de electrones para la respiración. Algunas bacterias como las heterótrofas pueden reducir perclorato (Wallace et al., 1996). Sin embargo, en informes anteriores (Soria, 2004; Fennix y Miranda, 2015), los procariontas halófilos, *archaea* (*Hfx. mediterranei*, *Hfx. denitrificans*) así como de las bacterias (*Halomonas halodenitrificans*), pueden reducir el perclorato en concentraciones de sal por encima de los de agua de mar (Oren et al., 2014).

Las sales de perclorato ejercen sus principales efectos fisiológicos en la glándula tiroidea. Por ser un potente disruptor endocrino inorgánico, bloquea la absorción de yoduro por la tiroides, inhibiendo así la síntesis de la hormona estimulante de la tiroides (Wolff, 1998; Agudelo y Castro, 2015; Waller et al., 2004). Agudelo y Castro (2015) indican que es importante reducir este contaminante en el ambiente, porque no solo produce cáncer de tiroides y afecta los sistemas nervioso, reproductivo, e inmunológico (Thrash et al., 2007), sino que también a concentraciones de 200-500 ppm perturba la metamorfosis de anfibios y algunos peces (Miwa y Inui, 1987; Shi, 2000; Einarsdóttir et al., 2006).

Las tecnologías disponibles para el tratamiento de perclorato se han probado y evaluado e incluyen: tratamientos biológicos por las bacterias reductoras de perclorato, reducción química de intercambio iónico utilizando resinas de intercambio iónico o carbón activado y la reducción electroquímica (Ryu et al., 2012).

3. ESTADO DEL ARTE

3.1. Generalidades.

De la Rosa et al., (2002), señala que en el año 1722, Leeuwenhoek observó y describió por primera vez las bacterias en distintos ambientes. Y supuso que «estos animálculos podían ser transportados por el viento mediante el polvo que flotaba en el aire». Después de esto, Gaultier de Claubry en 1855, estudió las partículas atmosféricas mediante un procedimiento en el que hacía borbotear el aire en agua destilada para retenerlas. Finalmente, Pasteur perfeccionó los procedimientos empleados por Claubry, en donde hacía pasar un volumen determinado de aire con la ayuda de un aspirador por algodón-pólvora colocado en un tubo de vidrio, que posteriormente se disolvía en alcohol-éter. En el líquido se depositaban todas las partículas del aire, entre ellas esporas de mohos y de bacterias. A su vez, Hesse (1884) diseñó un sistema que consistía de un tubo grueso recubierto en su interior de gelatina, para contar los microorganismos.

De la Rosa et al., menciona además, que otro de los investigadores que más estudio los microorganismos del aire fue Pierre Miquel, quien empleó un procedimiento basado en el fraccionamiento de los cultivos, con el objetivo de determinar el número de hongos y bacterias. Este método consistía en dirigir el aire en tubos de bolas y posteriormente en el año 1880, en un matraz de borboteo que contenían líquidos nutritivos estériles. Lo anterior, permitió que Miquel realizara numerosos y variados estudios, para calcular el número de microorganismos por m³ presentes en diferentes ambientes, la naturaleza de estos, sus propiedades patógenas, la influencia de diversos factores atmosféricos sobre ellos y la posibilidad de transmisión de enfermedades contagiosas por el aire. Sin embargo, en la época de 1901 fue difícil determinar el tipo de bacterias presentes en el aire. Miquel y Cambert (1901) afirmaron que la mayoría eran saprofitas y procedían del suelo; siendo las más frecuentes las bacterias cromógenas, los bacilos esporulados y los cocos.

3.2. Bacterias presentes en el aire.

En un estudio de caracterización de bioaerosoles atmosféricos realizado en la ciudad de Tijuana, México, se obtuvo que las concentraciones más altas de microorganismos fueron en los meses de julio y agosto (verano) y las concentraciones más bajas en invierno (Hurtado et al., 2014; Rosas et al., 2004).

También se demostró que las características cualitativas y cuantitativas de los microorganismos presentes en el aire varían dependiendo del lugar geográfico, como se evidencia también en un estudio realizado en Francia para la ciudad de Marsella y la isla de Porquerolles (Di Giorgio et al., 1996).

Los estudios de (Bovallius et al., 1978; Jones y Cookson, 1983; Lacey y Venette, 1995) permitieron establecer que las aerobacterias son más numerosas en las ciudades, con el registro de concentraciones máximas de 4.000 UFC/m³ y promedio de 850 UFC/m³; mientras que, en áreas rurales la máxima reportada es de 3.400 UFC/m³ y promedio 99 UFC/m³.

Roldán (2003), en una industria textil de la ciudad de Puebla, se muestreó el aire del área de producción, utilizándolos siguientes medios de cultivo: agar eosina azul de metileno (EMB), agar glucosa (AG) y agar soya tripticasa (TSA). Los cuales fueron expuestos por triplicado durante un minuto en cinco puntos en el área de producción, el muestreo se realizó durante una semana a las 12:00 h y los medios de cultivo se incubaron a temperatura ambiente (37°C) durante 24 horas. Las bacterias identificadas correspondieron a *Escherichia sp*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Enterobacter sp* y *Bacillus sp*.

En otro estudio realizado por (Borrego et al., 2008) en dos depósitos del Archivo Nacional de Cuba se determinó la concentración microbiana en el aire, se caracterizó y se describieron las características patogénicas de los microorganismos aislados. Dentro de las bacterias Gram positivas se aislaron los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* y *Streptomyces* y entre las Gram negativas *Serratia*, *Enterobacter* y *Hafnia*.

Méndez et al. (2015) aislaron e identificaron microorganismos presentes en la ciudad de Neiva-Colombia en el aire de una zona urbana, en el mes de junio (época de sequía) y noviembre (época de lluvias), para el año 2012. En este estudio, se emplearon dos métodos para la recolección de las muestras: sedimentación en placa y un bioimpactador M Air T de Millipore, en los cuales se dispensaron los medios Agar tripticasa soya (ATS) para el crecimiento de bacterias. En distintas zonas de muestreo se encontró que los bacilos Gram positivos fueron los microorganismos predominantes; mientras que, los bacilos Gram negativos presentaron frecuencia de aparición ocasional y rara, ya que no son considerados microorganismos propios del aire. La carga microbiana fue mayor en la época de sequía con respecto a la época de lluvias.

En cuatro sitios diferentes del campus de la *Jawaharlal Nehru University* (JNU), Nueva Delhi, India, se midieron los niveles de bioaerosol. Se encontró que las concentraciones más altas de Gram positivas (338,8 UFC/m²) y bacterias Gram negativas (614 UFC/m²) fueron encontradas en un vertedero de basura. Las bacterias Gram negativas fueron más predominantes que las bacterias Gram positivas; posiblemente, debido a que la temperatura ambiente fue más alta durante su toma de muestras (Srivastava et al., 2012).

Maldonado et al. (2014), en dos hospitales de León, Guanajuato, México realizaron un estudio piloto para determinar la calidad del aire en el año 2014. Se identificaron, determinaron y caracterizaron las aerobacterias dentro de estos sitios públicos. Los resultados obtenidos fueron: el hospital 1 presentó concentraciones de bacterias de 40 a 280 UFC/m³ con lo que su calidad de aire fue calificada como pobre, además de que en este aire se encontraron 17 géneros de bacterias. El hospital 2 con más años de servicio y mayor incidencia de pacientes presentó una mayor concentración de bacterias 90 a 548 UFC/m³, y se identificaron 17 géneros de bacterias. En cuanto al aislamiento e identificación de organismos, se encontraron más del tipo Gram negativos que Gram positivos en ambos hospitales. Las enterobacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter cancerogenus* y *Acinetobacter sp*, fueron predominantes y de importancia clínica para los usuarios del hospital, mientras que las bacterias del género *Bacillus* fueron las Gram positivas predominantes.

Un estudio realizado de mayo a septiembre de 2010 por Dybwad, et al.(2012) en una estación de metro, en Oslo, Noruega. Encontraron que la mayoría de las bacterias aerotransportadas identificadas pertenecieron a los géneros *Bacillus sp*, *Micrococcus sp* y *Staphylococcus sp*. Otro trabajo realizado por Okten y Asan (2012), en Edirne, Turquía se encontró que los principales agentes bacterianos en una zona cerca de un hospital, fueron: *Corynebacterium sp*, *Staphylococcus sp* y *Bacillus sp*. Por otro lado, en un estudio realizado en Beijing por Fang et al. (2007), se identificó que la mayoría de las bacterias aerotransportadas pertenecieron a los géneros *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp*, *Corynebacterium sp*, y *Pseudomonas sp*. En un estudio similar hecho por Rodríguez et al. (2016), para la ciudad mexicana de Mérida Yucatán, la mayoría de las bacterias aerotransportadas pertenecieron al género *Staphylococcus sp*, mientras que géneros *Bacilos sp*, *Lactobacilos sp*, *Planococcus sp*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Pantotea sp* y *Enterobacter sp*, fueron identificados en un informe anterior en la ciudad de México.

Por otra parte, García, et al. (2016) analizaron la diversidad de bacterias aerotransportadas a nivel de géneros en el Área Metropolitana de la Ciudad de

México y encontraron que el género bacteriano más abundante fue *Bacillus spp*, una bacteria Gram positivas del filo *Firmicutes*. Este género era más abundante, especialmente durante la temporada de otoño (noviembre) del 2010 con el 62,8% de abundancia relativa.

Así mismo, Wallace et al. (1996) aislaron, de un digestor anaerobio municipal una bacteria codificada como HAP-1, un Bacilo Gram negativa de 0.5 μm de ancho y 2-8 μm de longitud, con capacidad para reducir concentraciones mayores de 7000 ppm de perclorato en aguas residuales. Han demostrado, además, que el organismo reduce el perclorato y clorato independientemente de la presencia de nitratos y utiliza el perclorato o clorato como aceptor terminal de electrones. Las características fisiológicas y morfológicas demostraron que la bacteria HAP-1 pertenece al género y especie *W. succinogenes*.

En general, en la literatura se evidencia que los estudios de caracterización bacteriológica son escasos y en particular en ambientes marinos. Adicionalmente, los estudios en donde se hacen asociaciones entre la presencia de bacterias y la calidad del aire a nivel nacional e internacional son muy escasos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bacteriológicamente el material particulado proveniente del aire de la Bocana ubicado en la ciudad de Cartagena de Indias mediante la estandarización de un protocolo para aislar las bacterias presentes en el aire.

4.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y caracterizar microscópica y bioquímicamente las bacterias aisladas del aire del ambiente marino de la Bocana.
- Correlacionar las variables meteorológicas con la concentración de material particulado.
- Calcular las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).
- Realizar ensayos de susceptibilidad de NaCl y $KClO_4$ a los géneros bacterianos identificados.

5. METODOLOGÍA

Para la caracterización e identificación de las bacterias presentes en el aire de un ambiente marino de la ciudad de Cartagena de Indias, se recolectaron un total de 30 muestras de aire para los dos meses muestreados (agosto y septiembre) del 2015 en el sector de la Bocana (10°27'10,5" N - 75°30'27,9" W), como se presenta en la Figura 11.

Esta investigación fue de tipo experimental y cuantitativa. Se dividió en tres etapas:

5.1. Etapa I: Campaña de monitoreo de material particulado.

Esta campaña consistió en recolectar muestras de material particulado por medio de dos equipos de bajo volumen semiautomáticos (muestreador de aire BGI modelo PQ200), como se presenta en la Figura 12, proveídos por el EPA Cartagena. Uno para determinar la concentración del material particulado y el otro para la caracterización bacteriológica. La importancia de tener dos equipos de muestreo se debe a que la muestra obtenida para determinar concentración de material particulado se desecaba, es decir, quitar la humedad de los filtros. Lo anterior genera la muerte de los microorganismos presentes en el filtro. Por lo tanto, se hizo necesario tener otro equipo con el cual se caracterizara bacteriológicamente el material particulado. Los filtros utilizados para realizar la caracterización bacteriológica fueron previamente esterilizados para evitar contaminación cruzada.

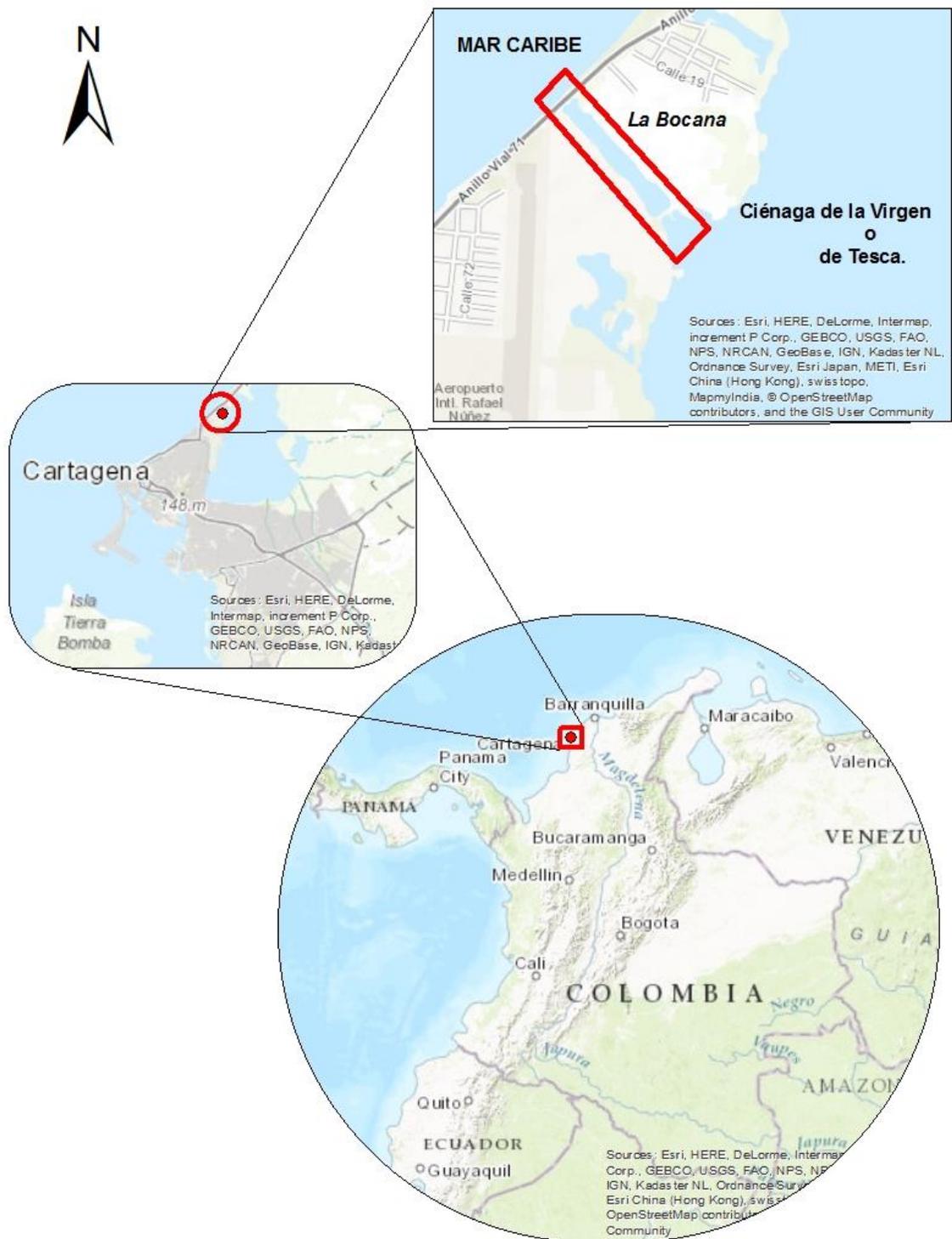


Figura 11. Ubicación del área de estudio
Fuente: Nieves, L. (2017)



Figura 12. Instalación de los equipos de monitoreo de calidad de aire y estación meteorológica (BGI modelo PQ200)
Fuente: autoría propia

Con ambos equipos se realizaron muestreos en periodos de 24 horas de forma simultánea. Posteriormente, se determinó, por análisis gravimétrico, la concentración de material particulado PM10.

Todas las muestras fueron transportadas en un porta *cassette* previamente esterilizado. Se conservaron en refrigeración a 4°C y luego fueron llevadas al Laboratorio de Biología de la Universidad Tecnológica de Bolívar para su procesamiento.

En forma general, las actividades que se realizaron durante el muestreo en la Bocana se observan en la Figura 13.

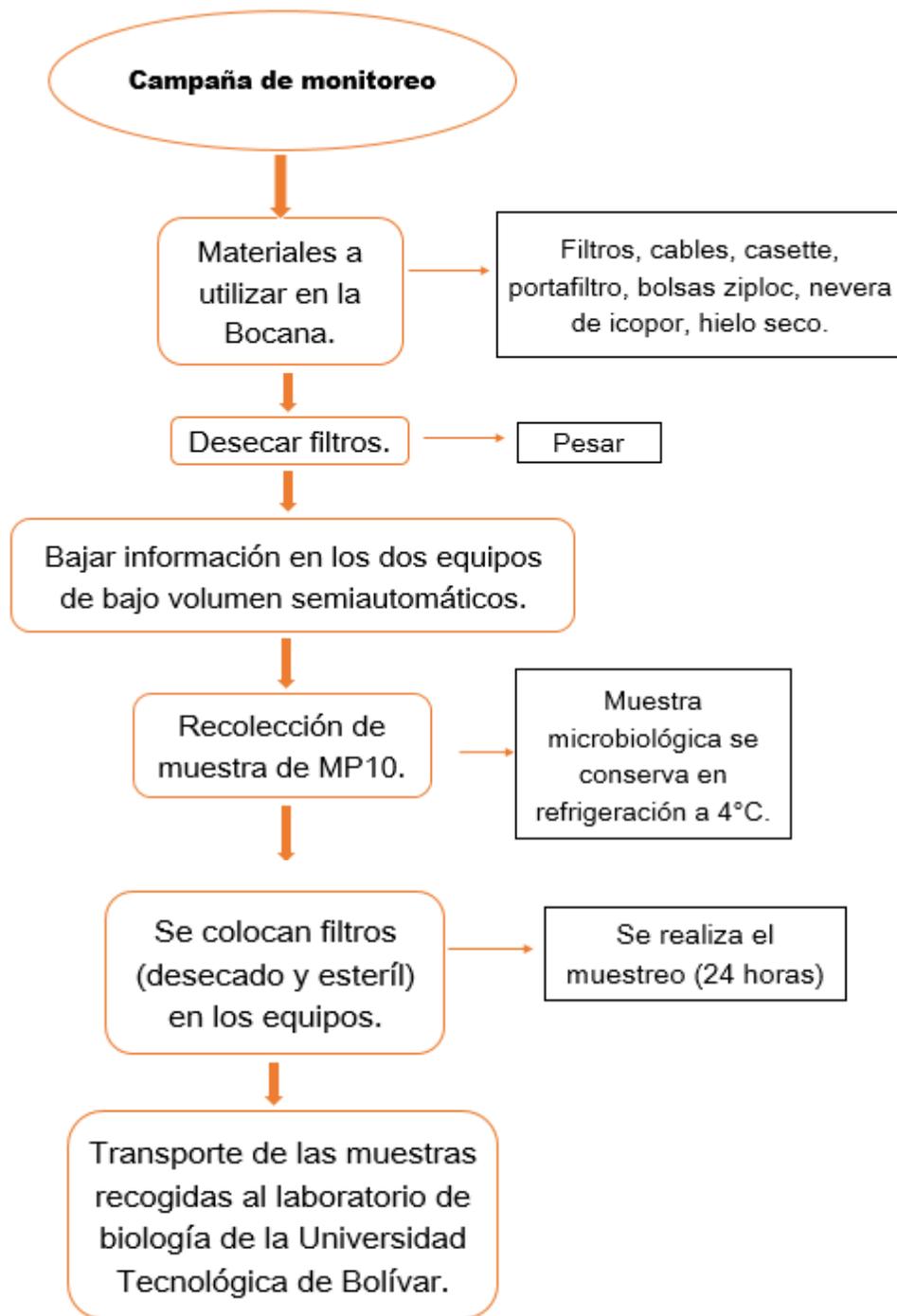


Figura 13. Diagrama de flujo de la campaña de monitoreo
Fuente: autoría propia

5.2. Etapa II: Aislamiento y caracterización de las bacterias presentes en el material particulado (PM10).

La descripción de las actividades realizadas en esta etapa se encuentra resumida en la Figura 15 y a continuación son descritas.

5.2.1. Recolección de muestras.

Las muestras de microorganismos, a partir del material particulado de ambientes marinos, fueron recogidas en la Bocana Estabilizadora de mareas de la ciudad de Cartagena de Indias. Estas muestras de PM10 se recolectaron en un equipo de bajo volumen semiautomático (PQ200), en un filtro de 47 mm nuevo y sin daño alguno (Figura 14).

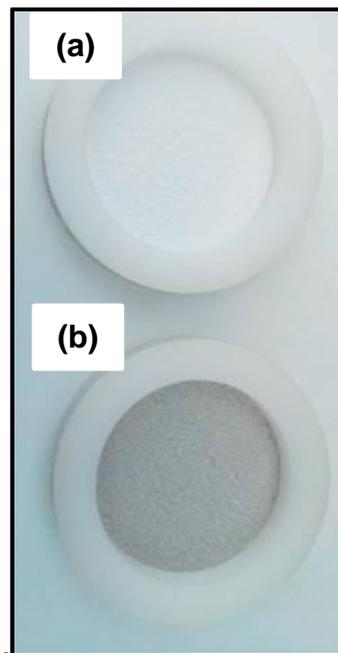


Figura 14. Filtros de película PTFE. (a) filtro sin muestra de material particulado y (b) filtro con muestra de material particulado

Fuente: autoría propia

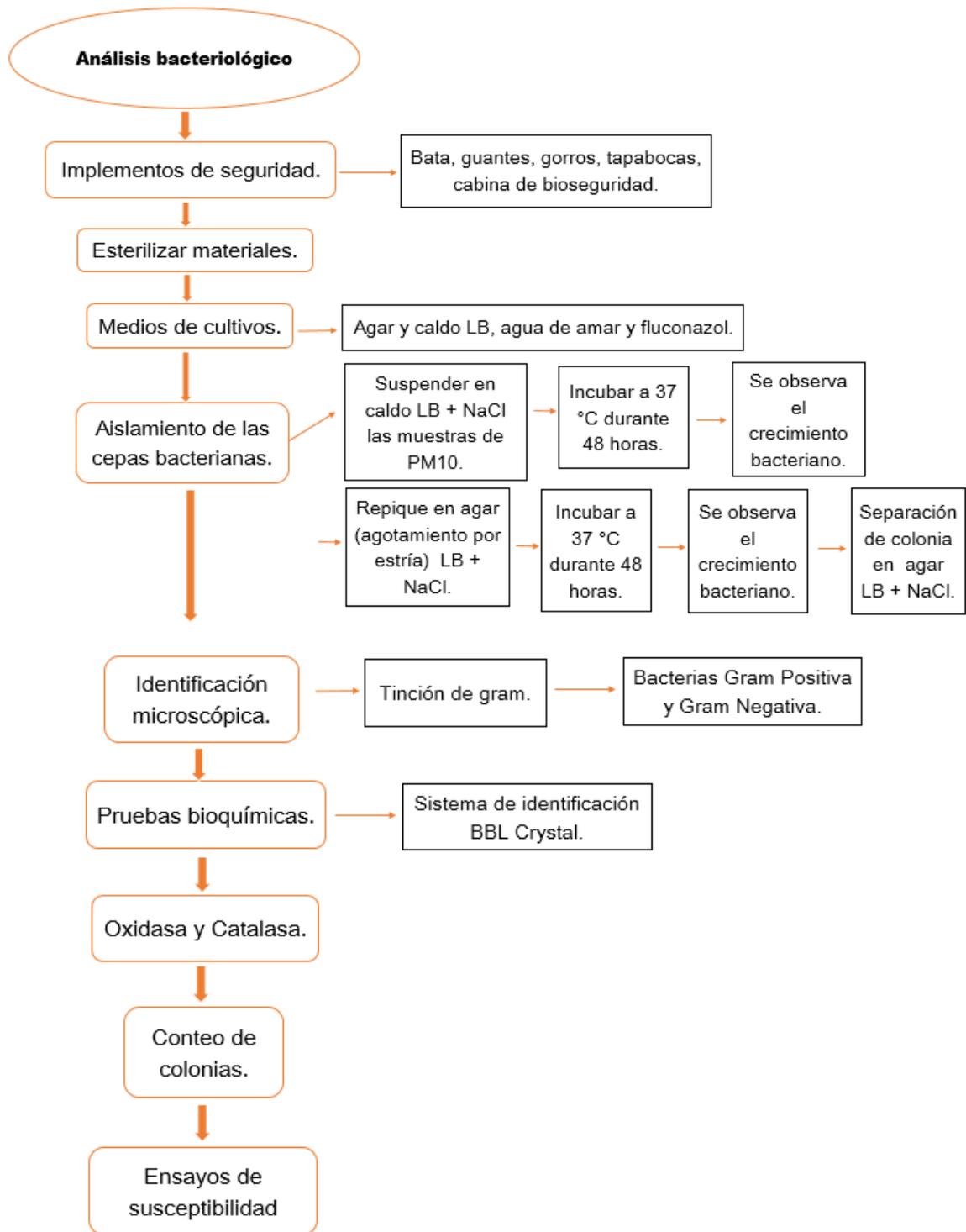


Figura 15. Diagrama de flujo del análisis bacteriológico
Fuente: autoría propia

5.2.2. Aislamiento de las cepas bacteriana a partir del material particulado.

En una cabina de flujo laminar, se tomó un hisopo estéril y se rotó en cada filtro que contenía PM10 (Figura 16a). Luego, fue inoculado en *Caldo Luria Bertani* © (LB) cuya composición para 1 L es: 10 g Triptona, 5 g Extracto de levadura, 10 g NaCl, 2000 mg de fluconazol para inhibir el crecimiento de hongos y 1000 mL de agua de mar previamente filtrada y esterilizada. Posteriormente, las cepas bacterianas se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones aerobias (Kerstens y Vancanneyt, 2005). Por último, se volvió a suspender mediante un asa de siembra en Agar LB modificado con agua de mar e incubado a 37 °C por 48 horas (Figura 16 b y c); transcurrido este tiempo, se verificó el crecimiento bacteriano mediante la observación de colonias.

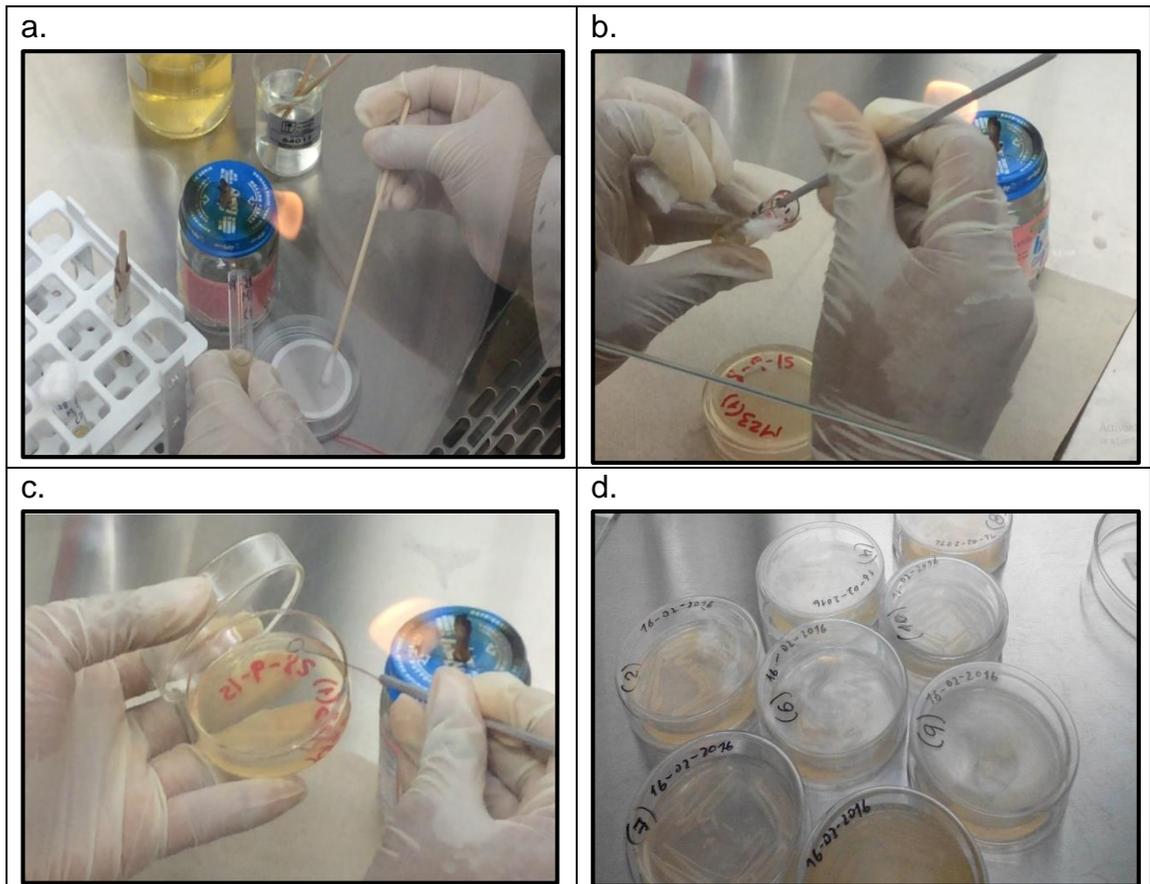


Figura16. Aislamiento de cepas bacterianas: (a) Siembra en caldo LB, (b) y (c) siembra en agar LB y d) cepas aisladas

Fuente: autoría propia

5.2.3. Identificación microscópica.

Las colonias bacterianas aisladas en medio LB fueron tomadas y repicadas en tres oportunidades utilizando la técnica de agotamiento por estrías para garantizar así el aislamiento de cada una de ellas. Después del tercer repique, las colonias bacterianas representativas aisladas en el Agar LB se les realizó la identificación microscópica mediante la técnica de tinción de Gram para bacterias Gram positivas y Gram negativas, empleando un microscopio *Olympus BX41*, de acuerdo con las claves taxonómicas sugeridas por el Manual de Bergys (2008) y el Atlas Microbiológico de Koneman (2008). En cada caso, se registraron las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de cada grupo bacteriano identificado.

5.2.4. Purificación bacterias aisladas.

Una colonia de las cepas aisladas fue transferida finalmente en agar Luria Bertani © (LB) (Figura 16 d) e incubadas a 37°C durante 48 horas para posteriores ensayos.

5.2.5. Identificación bioquímica.

El perfil metabólico de las bacterias se determinó empleando el sistema de identificación BBL Crystal™ Kit ID para bacterias Gram negativas y Gram positivas, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Además, se realizaron la prueba de Oxidasa, Catalasa (Kerstens y Vancanneyt, 2005) (Figura 17).

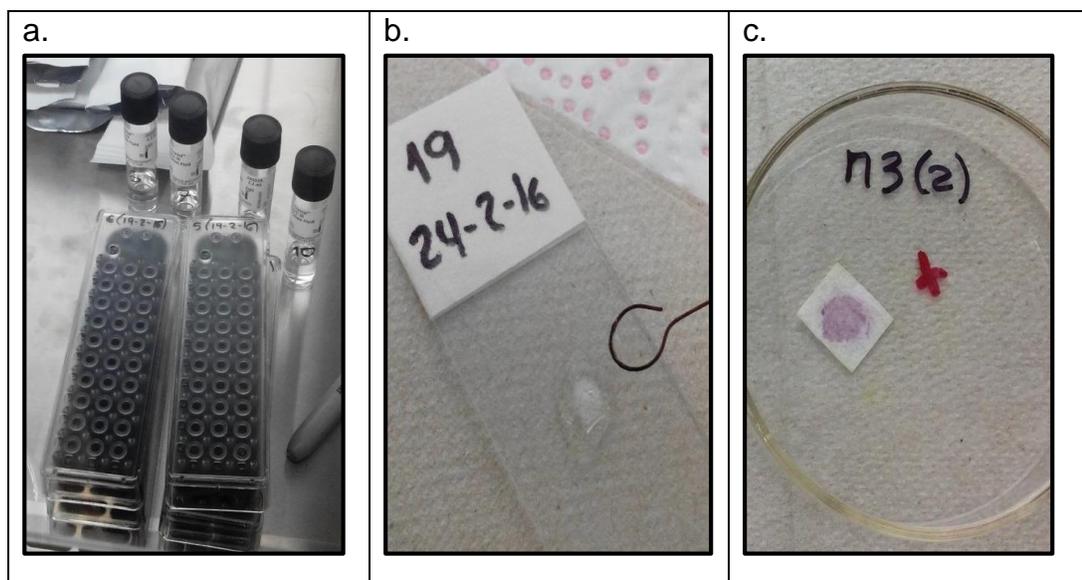


Figura 17. Identificación bioquímica: (a).BBL Crystal™ Kit ID, (b) catalasa y (c) oxidasa
Fuente: autoría propia

5.2.6. Conteo de colonias.

Las colonias de las cepas aisladas fueron transferidas en agar *Luria Bertani* © (LB) utilizando la técnica de agotamiento por estrías e incubadas a 37 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se verificó el crecimiento bacteriano y se realizó el conteo de colonia utilizando un *LBX Zoom Stereo Microscope* en cada una de las cajas de Petri que contenía las cepas bacterianas, tal como se ilustra en la Figura 18.



Figura 18. Conteo de colonia utilizando un LBX Zoom Stereo Microscope
Fuente: autoría propia

Las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) se determinaron mediante la ecuación:

$$X = \frac{C}{V}$$

Ecuación 1. Calculo de unidades formadora de colonia por mililitro de solución.

Donde X es el número de colonia por mililitro de solución (UFC/mL), C es el número de colonia, equivalente a la medida total de las colonias en la caja de Petri y V es el volumen del medio de cultivo tomado, que para este estudio fue de 25 mL. La concentración se reportó como las unidades formadoras de colonias por mililitros de solución.

5.2.7. Pruebas de susceptibilidad.

Los géneros bacterianos identificados se expusieron a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y perclorato de potasio para determinar el grado de tolerancia o de susceptibilidad a estos compuestos.

- Ensayos de susceptibilidad al cloruro de sodio (NaCl).

Una colonia de las cepas aisladas fue transferida en agar Luria Bertani © (LB) e incubadas a 37°C durante 24 horas; transcurrido ese tiempo, se suspendieron en caldo LB con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) (50000 ppm, 75000 ppm, 150000 ppm, 300000 ppm) (Figura 19). Se identificaron como bacterias resistentes al cloruro de sodio (NaCl) aquellas que presentaron biopelículas, turbidez (0,5 densidad óptica) y cambio de color a las 24 horas después de suspendida en caldo. Finalmente, se sembraron en Agar LB e incubadas a 37°C durante 24 horas para verificar el crecimiento bacteriano mediante la observación de colonias y se realizó tinción de Gram para confirmar la pureza de las cepas.

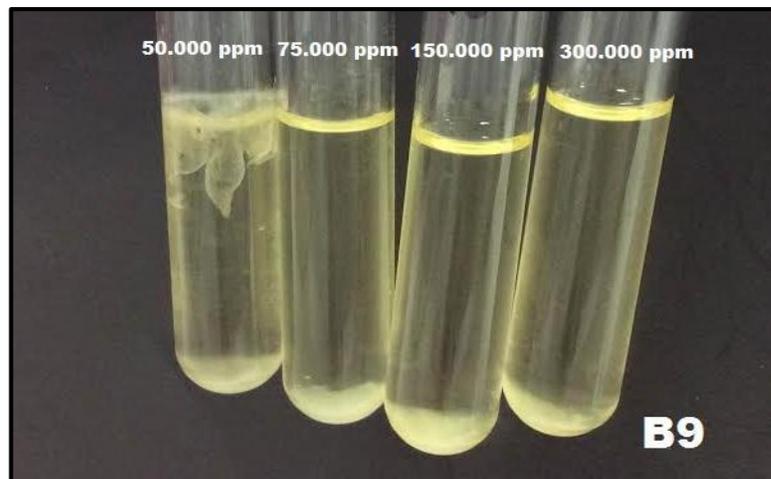


Figura 19. Concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)
Fuente: autoría propia

Los cálculos de las concentraciones de NaCl para la realización de la prueba de susceptibilidad se presentan en la Tabla 3. Se prepararon dos soluciones: la solución 1 (5g de caldo LB + 200 mL H₂O de mar filtrada + 60 g NaCl), que contenía la concentración de 300.000 ppm de NaCl. Y la solución 2 (5g de caldo LB + 200 mL H₂O de mar filtrada + 2 cápsulas de fluconazol), el medio de cultivo para facilitar

el crecimiento de las bacterias. Estas dos soluciones se combinaron según lo descrito en la Tabla 3 para obtener las diferentes concentraciones de NaCl (300.000 ppm, 150.000 ppm, 75.000 ppm, 50.000 ppm), en un volumen final de 3mL.

Tabla 3. Cálculos concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)

| Solución 1 (mL) | Solución 2 (mL) | Volumen final (mL) | Concentración NaCl ppm |
|-----------------|-----------------|--------------------|------------------------|
| 3,00 | 0,00 | 3,00 | 300.000 |
| 1,50 | 1,50 | 3,00 | 150.000 |
| 0,75 | 2,25 | 3,00 | 75.000 |
| 0,50 | 2,50 | 3,00 | 50.000 |

- Ensayos de susceptibilidad al perclorato de potasio (KClO₄).

Las colonias de las cepas aisladas fueron transferidas en agar Luria Bertani © (LB) e incubadas a 37°C durante 24 horas; transcurrido ese tiempo, se suspendieron en caldo LB con diferentes concentraciones de perclorato de potasio (KClO₄) (250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, 1250 ppm) (Figura 20). Identificándose como bacterias resistentes al perclorato (KClO₄) aquellas que presentaron formación de biopelículas, turbidez y/o cambio de color a las 24 horas después de suspendida en caldo. Finalmente, se sembraron en Agar LB y fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas para verificar el crecimiento bacteriano mediante la observación de colonias y se realizó tinción de Gram para confirmar la pureza de las cepas.

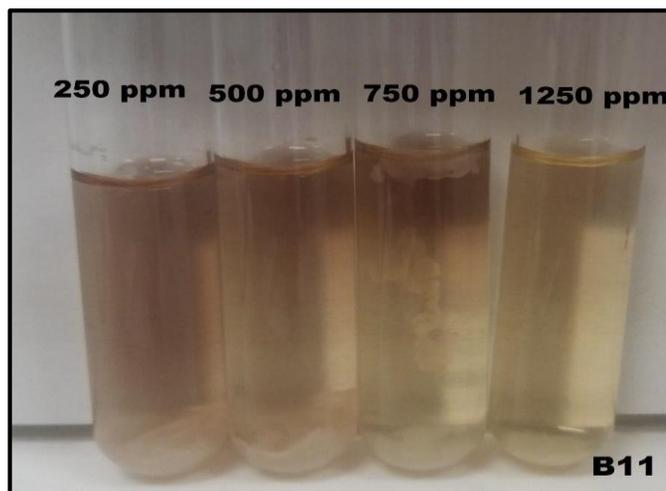


Figura 20. Concentraciones de perclorato de potasio (KClO₄)

Fuente: autoría propia

Las concentraciones de KClO_4 para la realización de la prueba de susceptibilidad, se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Cálculos concentraciones de perclorato (KClO_4)

| KClO_4 (g) | Volumen caldo LB (mL) | Concentración KClO_4 (ppm) |
|---------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 2,750 | 3,00 | 250 |
| 5,500 | 3,00 | 500 |
| 8,250 | 3,00 | 750 |
| 13,75 | 3,00 | 1.250 |

Se prepararon 4 soluciones en las proporciones indicadas en la Tabla 4 (gramos de KClO_4 y 3,00mL de caldo LB) y se combinaron para obtener las concentraciones de 250, 500, 750 y 1.250 de KClO_4 .

5.3 Etapa III: Análisis de correlación de variables meteorológicas, concentración de PM10.

En esta etapa final, se relacionaron linealmente los parámetros meteorológicos y la concentración de PM10, para ello se llevaron a cabo las siguientes actividades.

- A. Se organizó y depuró la información meteorológica y de concentración de PM10. Los datos obtenidos durante la campaña de monitoreo, fueron copiados de forma organizada en una base de datos. Esto permitió la visualización de cada uno de ellos. De esta forma se verificaba la presencia de datos faltantes o datos atípicos, que quitaran veracidad a los cálculos posteriores.
- B. Se identificó por medio de rosas de vientos la dirección y velocidad del viento predominante durante los periodos de muestreo y se analizaron las variaciones de temperatura y humedad.
- C. Se correlacionaron las variables meteorológicas y la concentración de PM10 a través de una regresión lineal.

6. RESULTADOS

Siguiendo la metodología antes mencionada para caracterizar e identificar las bacterias presentes en el aire de la ciudad de Cartagena de Indias, se presentan los siguientes resultados.

6.1. Análisis bacteriológico.

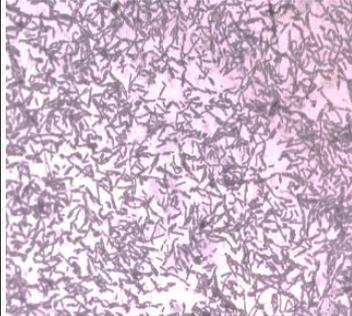
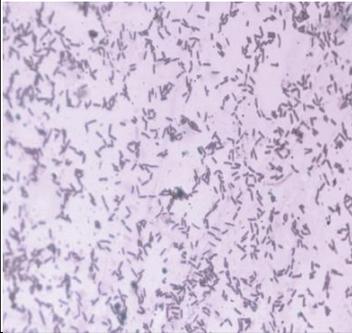
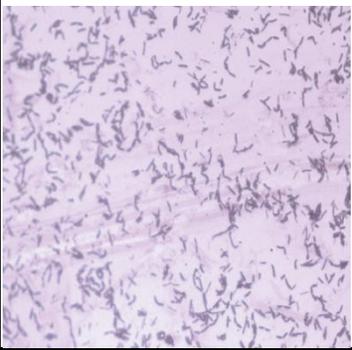
De un total de 30 muestras de material particulado (PM10) obtenidas durante los meses de agosto y septiembre, sólo 12 muestras fueron aisladas e identificadas bacteriológicamente y bioquímicamente, debido a la presencia de crecimiento de hongos en el resto de las muestras. De estas muestras fueron aisladas 5 bacterias marinas del género *Bacillus*. con base al manual de Beryis (2008) y el Atlas Microbiológico de Koneman (2008) (Tabla 5 y 6).

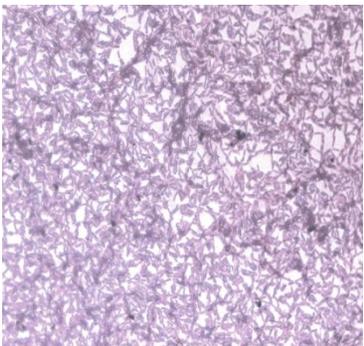
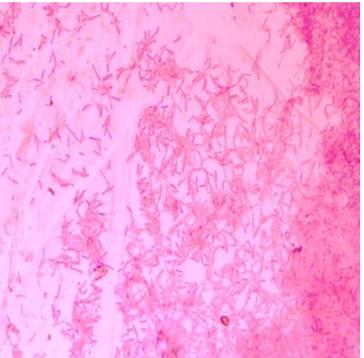
Tabla 5. Aislamiento de bacterias en muestras de material particulado (PM10) provenientes de la Bocana, Cartagena de Indias

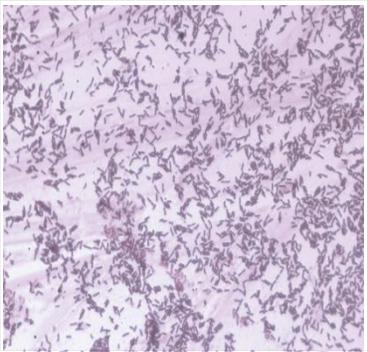
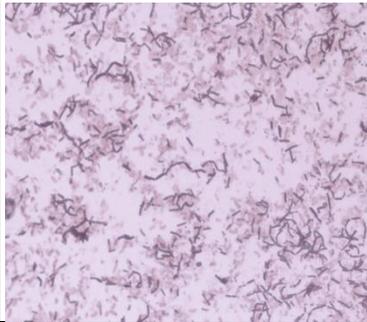
| Código Colonia | Muestra | Método de aislamiento | Género |
|----------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| B01 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus marisflavis</i> |
| B02 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus flexus</i> |
| B03 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus flexus</i> |
| B04 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus marisflavis</i> |
| B05 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus cohnii</i> |
| B06 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus spp</i> |
| B07 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus marisflavis</i> |
| B08 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus marisflavis</i> |

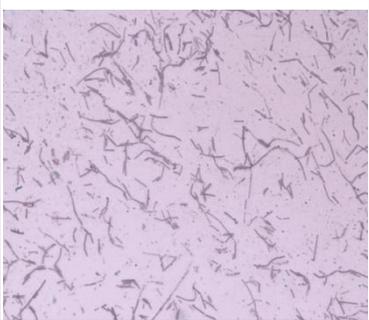
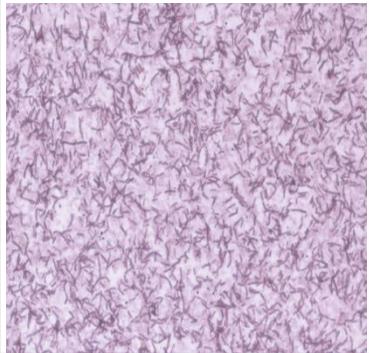
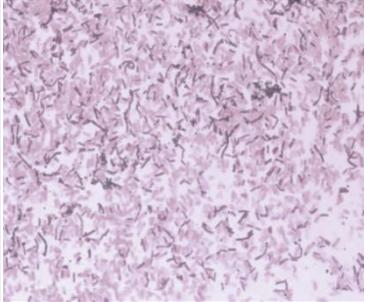
| | | | |
|------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| B09 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus cohnii</i> |
| B10 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus sp</i> |
| B11 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus marisflavis</i> |
| B12 | Material particulado | LB-caldo Agua de mar | <i>Bacillus marisflavis</i> |

Tabla 6. Caracterización microscópica y bioquímica de las bacterias aisladas del Material particulado en la Bocana.

| Código colonia | Nombre científico | Evidencia Fotográfica | Descripción Microscópica | Oxidasa | Catalasa | Tinción de Gram | Hábitat | Observaciones |
|----------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------|----------|-----------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| B01 | <i>Bacillus marisflavis</i> |  | Forma: Bacilos alargados. | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias pequeñas de color beige, convexas, forma puntiforme y circular, bordes redondeados, forman cadenas largas de textura pegajosas. |
| B02 | <i>Bacillus flexus</i> |  | Forma: Diplobacilos pequeños y gruesos | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias medianas de textura viscosa, color claro y forma irregular con elevación pulvinada. |
| B03 | <i>Bacillus flexus</i> |  | Forma: Streptobacilos | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias de color naranja, pegajosa, forma puntiforme y con elevación convexa. |

| | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---|---|---|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| B04 | <i>Bacillus marisflavis</i> |  | Forma: Diplobacilos semialargados | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias medianas elevadas de color beige, forma circular, bordes redondeados y con barrido plano. |
| B05 | <i>Bacillus cohnii</i> |  | Forma: Diplobacilos semialargados | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias de color beige, forma irregular, viscosidad moderada, elevación convexa y margen ondulado con barrido delgado. |
| B06 | <i>Bacillus spp</i> |  | Forma: Bacilos alargados | + | + | - | Aerosoles marinos | Colonias pequeñas de color naranja con forma irregular y elevación convexa. |

| | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---|---|---|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| B07 | <i>Bacillus marisflavis</i> |  | Forma: Diplobacilos pequeños y gruesos | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias de color beige de forma irregular y puntiforme, elevación convexa y margen ondulado. La muestra creció demasiado y cubrió la capa del agar. |
| B08 | <i>Bacillus marisflavis</i> |  | Forma: Bacilos alargados | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias de color amarillo, forma irregular y margen ondulado. |
| B09 | <i>Bacillus cohnii</i> |  | Forma: Diplobacilos | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias grandes de color beige, filamentosa con protuberancia en el centro (elevación umbonada), margen ondulado. Las colonias tienen viscosidad abundante y ocuparon todo el agar. |

| | | | | | | | | |
|------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---|---|---|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| B10 | <i>Bacillus sp</i> |  | Forma: Diplobacilos alargados y vibrios | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias pequeñas de color beige, filamentosas, margen lobulado, aspecto liso y rugoso, se extiende en el medio de cultivo y dan aparición de cultivo mixto. |
| B11 | <i>Bacillus marisflavis</i> |  | Forma: Bacilos semialargados gruesos, esporulados y vibrios. | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias de color beige, margen ondulado, forma irregular, viscosidad moderada y elevación convexa. |
| B12 | <i>Bacillus marisflavis</i> |  | Forma: Diplobacilos pequeños y gruesos, vibrios. | + | + | + | Aerosoles marinos | Colonias pequeñas de color beige, forma puntiforme e irregular, borde lobulado, elevación pulvinada y las colonias se agrupan como bolitas. |

De acuerdo con las tablas 5 y 6, de las 12 muestras analizadas, se identificó un género de bacterias típicas de ambientes marinos: *Bacillus* (Degobbi et al., 2011). Cuatro (4) especies de bacterias fueron Gram positivas (*Bacillus marisflavis*, *Bacillus sp*, *Bacillus cohnii* y *Bacillus flexus*) representando el 92% y una Gram negativa (*Bacillus spp*) representando el 8% del total de las muestras.

6.2. Identificación bioquímica.

En las Tablas 8 y 9 se presentan el cuadro del perfil metabólico para bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente.

En estos resultados bioquímicos, se observó la presencia de cinco especies bacterianas que corresponden a: *Bacillus marisflavis*, *Bacillus sp*, *Bacillus cohnii*, *Bacillus flexus* y *Bacillus spp*.

Tabla 7. Actividad bioquímica de bacterias Gram positivas aisladas en la Bocana, ambiente marino de la ciudad de Cartagena

| COLONIA | flourescentnegative control | 4MU-β-D-glucoside | L-valine- AMC | L-phenylalanine- AMC | 4MU-α-D-glucoside | L-pyroglutamicacid-AMC | L-tryptophan-AMC | L-arginine-AMC | 4MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide | 4MU-phosphate | 4MU-β-D-glucuronide | L-isoleucine-AMC | Trehalose | Lactose | Methyl-α-&-β-glucoside | Sucrose | Mannitol | Maltotriose | Arabinose | Glycerol | Fructose | p-nitrophenyl-β-D-glucoside | p-nitrophenyl-β-D-cellobioside | Proline&Leucine-p-nitroanilide | p-nitrophenyl-phosphate | p-nitrophenyl-α-D-maltoside | o-nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG) & p-nitrophenyl-α-D-galactoside | Urea | Esculin | Arginine | Oxidasa | Catalasa | | |
|---------|-----------------------------|-------------------|---------------|----------------------|-------------------|------------------------|------------------|----------------|--------------------------------|---------------|---------------------|------------------|-----------|---------|------------------------|---------|----------|-------------|-----------|----------|----------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------|---------|----------|---------|----------|---|---|
| B01 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | |
| B02 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| B03 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| B04 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| B05 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| B07 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| B08 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| B09 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| B10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| B11 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| B12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |

+, Reacción positiva. -, reacción negativa. B01. *Bacillus marisflavis*. B02. *Bacillus flexus*. B03. *Bacillus flexus* B04. *Bacillus marisflavis*. B05. *Bacillus cohnii*. B07. *Bacillus sp*. B08. *Bacillus sp* B09. *Bacillus cohnii* B10. *Bacillus sp*. B11. *Bacillus marisflavis*. B12. *Bacillus marisflavis*.

Tabla 8. Actividad bioquímica de bacterias Gram negativas aisladas en la Bocana, ambiente marino de la ciudad de Cartagena

| COLONIA | |
|-----------------------------|---|
| Arabinosa | - |
| Manosa | - |
| Sacarosa | - |
| Melibiososa | - |
| Ramnosa | - |
| Sorbitol | - |
| Manitol | + |
| Adonitol | - |
| Galactosa | - |
| Inositol | - |
| p-n-p-fosfato | - |
| p-n-p a-β-glucósido | - |
| p-n-p-β-galactósido | - |
| Prolinamitroanilida | - |
| p-n-p bis-fosfato | - |
| p-n-p-xilósido | - |
| p-n-p-a-arabinósido | - |
| p-n-p-fosforilcolina | - |
| p-n-p-β-glucurónido | - |
| p-n-p-N-acetil glucosamida | - |
| γ-L-glutamil p-nitroanilida | - |
| Esculina | - |
| p-nitro-DL-fenilalanina | - |
| Urea | - |
| Glicina | - |
| Citrato | - |
| Ácido malónico | - |
| Cloruro de trifentetrazolio | + |
| Arginina | - |
| Lisina | + |
| Oxidasa | + |
| Catalasa | + |

+, Reacción positiva. -, reacción negativa. B06. *Bacillus spp.*

6.3. Conteo de colonias.

En el área de estudio (Bocana) el género identificado fue: *Bacillus*. Así mismo, *Bacillus* Gram positivas fueron las bacterias más abundantes.

En la Tabla 9 se presentan los análisis de concentraciones de bacterias en unidades formadoras de colonias por mL de solución. Estas concentraciones se determinaron mediante la ecuación 1.

Tabla 9. Conteo de colonia por mililitro de solución.

| Nombre científico | UFC / mL de solución |
|-----------------------------|----------------------|
| <i>Bacillus marisflavis</i> | 86 |
| <i>Bacillus flexus</i> | 9 |
| <i>Bacillus cohnii</i> | 9 |
| <i>Bacillus sp</i> | 22 |

De acuerdo a la Tabla 9, la especie más abundante del genero *Bacillus*, fue *Bacillus marisflavis*, con 86 UFC/mL de solución.

6.4. Pruebas de susceptibilidad.

6.4.1. Ensayos de susceptibilidad al NaCl.

Los microorganismos aislados en la Bocana (*Bacillus marisflavis*, *Bacillus sp*, *Bacillus cohnii*, *Bacillus flexus*) fueron expuestas a varias concentraciones de cloruro de sodio (50.000 ppm, 75.000 ppm, 150.000 ppm, 300.000 ppm), como se muestra en la Tabla 10. Los resultados obtenidos de la prueba de susceptibilidad, sugieren que son bacterias típicas de ambientes marinos, debido a que sobrevivieron a concentraciones de NaCl mayores a las del agua de mar (35.000 ppm) (Anderson, 2003).

Tabla 100. Pruebas de susceptibilidad al cloruro de sodio de bacterias aisladas a partir del material particulado

| Código colonia | Nombre científico | Concentración en ppm | | | | Observaciones |
|----------------|-----------------------------|----------------------|--------|----------------|----------------|--------------------------------------|
| | | 50.000 | 75.000 | 150.000 | 300.000 | |
| B01 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R | R | R | R | Crecimiento normal |
| B03 | <i>Bacillus flexus</i> | R | R | R | S | Crecimiento normal hasta 150.000 ppm |
| B04 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R | R | R | R | Crecimiento normal |
| B05 | <i>Bacillus cohnii</i> | R | R | R | S | Crecimiento normal hasta 150.000 ppm |
| B06 | <i>Bacillus spp</i> | R | R | R ^x | S ^x | Crecimiento normal hasta 150.000 ppm |
| B07 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R | R | R | R | Crecimiento normal |
| B08 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R | R | R | S | Crecimiento normal hasta 150.000 ppm |
| B09 | <i>Bacillus cohnii</i> | R* | R* | R | R | Crecimiento normal |
| B10 | <i>Bacillus sp</i> | R | R | R | R | Crecimiento normal |
| B11 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R ^{*x} | R | R | R | Crecimiento normal |
| B12 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R* | R* | R | R | Crecimiento normal |

S, sensible (no se observa crecimiento). R, resistente (se observa crecimiento). *, Formación de biopelículas. x, cambio de color.

Como se observa en la Tabla 10, las colonias B03, B05, B06 y B08 al ser expuestas a concentraciones de 150.000 ppm de NaCl, presentaron cambios de color y formación de biopelículas. A diferencia de B01, B04, B07, B09, B10, B11 y B12, que a concentraciones de 300.000 ppm de NaCl, presentaron crecimiento normal (condiciones de: 37°C, 12 y 24 horas, sin formación de *biofilms* u otra estructura que indique estrés por condiciones extremas). Sin embargo, todas las colonias presentaron alto grado de tolerancia al ser expuestas a concentraciones de NaCl, mayor a las del agua de mar (35.000 ppm).

6.4.2. Ensayos de susceptibilidad al KClO₄.

Las colonias bacterianas aisladas a partir del material particulado toleraron concentraciones relativamente altas de perclorato de potasio (KClO₄) como se muestra en la Tabla 11. Estas bacterias presentaron crecimiento normal y se observaron cambios de color y formación de biopelículas en varias de las cepas bacterianas analizadas.

Estos resultados muestran que las bacterias toleraron el perclorato en concentraciones de 250 ppm a 1250 ppm. Lo que indica, que pueden ser potencialmente utilizadas para degradar este contaminante en ambientes marinos.

Tabla 111. Pruebas de susceptibilidad al perclorato de bacterias aisladas a partir del material particulado.

| Código cepa | Nombre científico | Concentración en ppm | | | | |
|-------------|-----------------------------|----------------------|------|------|------|--------------------|
| | | 250 | 500 | 750 | 1250 | Observaciones |
| B01 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R/R | R/R | R/R | R/R | Crecimiento normal |
| B03 | <i>Bacillus flexus</i> | R/R | R/R | R/R | R/R | Crecimiento normal |
| B04 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R/R | R/R* | R/R* | R/R | Crecimiento normal |
| B05 | <i>Bacillus cohnii</i> | R/R | R/R | R/R | R/R | Crecimiento normal |
| B06 | <i>Bacillus spp</i> | R/R | R/R | R/R | R/R | Crecimiento normal |
| B07 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R/R | R/R | R/R* | R/R | Crecimiento normal |
| B08 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R/R | R/R | R/R | R/R | Crecimiento normal |
| B09 | <i>Bacillus cohnii</i> | R/R* | R/R | R/R | R/R | Crecimiento normal |
| B10 | <i>Bacillus sp</i> | R/R | R/R | R/R* | R/R | Crecimiento normal |
| B11 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R/R*x | R/R | R/R | R/R | Crecimiento normal |
| B12 | <i>Bacillus marisflavis</i> | R/R* | R/R* | R/R* | R/R | Crecimiento normal |

S, sensible (no se observa crecimiento). R, resistente (se observa crecimiento). *, Formación de biopelículas. x, cambio de color.

6.5. Variables meteorológicas

Después de realizar las campañas de monitoreo de material particulado (PM10) en la estación de la Bocana y obtener la información de las variables meteorológicas de la estación de la Aeronáutica civil (Aeropuerto Rafael Núñez), se procedió a realizar la depuración y análisis de datos.

Para conocer la velocidad y la dirección predominante del viento del sitio muestreado, se realizó una rosa de viento, que se muestra a continuación.

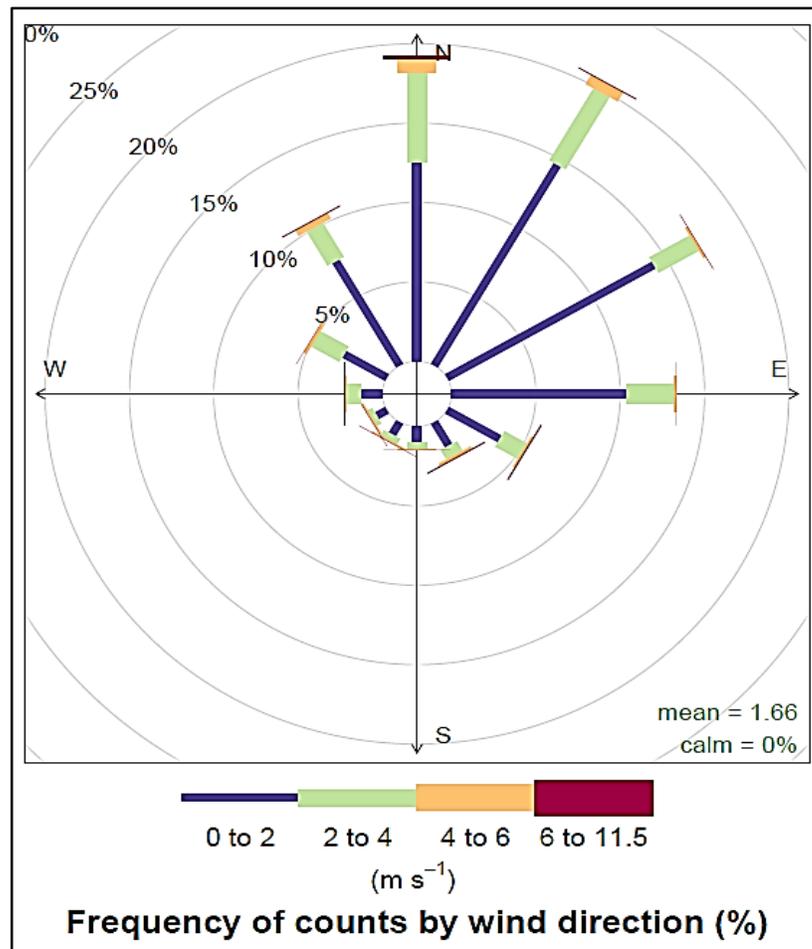


Figura 21. Rosa de vientos para el mes de agosto y septiembre 2015.

En la Figura 21, se observa que para los meses de agosto y septiembre del año 2015, la velocidad de viento predominante fue de 0 a 2 m/s y la dirección predominante del viento fue Noreste.

6.6. Relación entre variables meteorológicas vs concentración de PM10.

Las variables meteorológicas usadas en este estudio fueron la temperatura, humedad relativa y la velocidad del viento las cuales se muestran en la Figura 22.

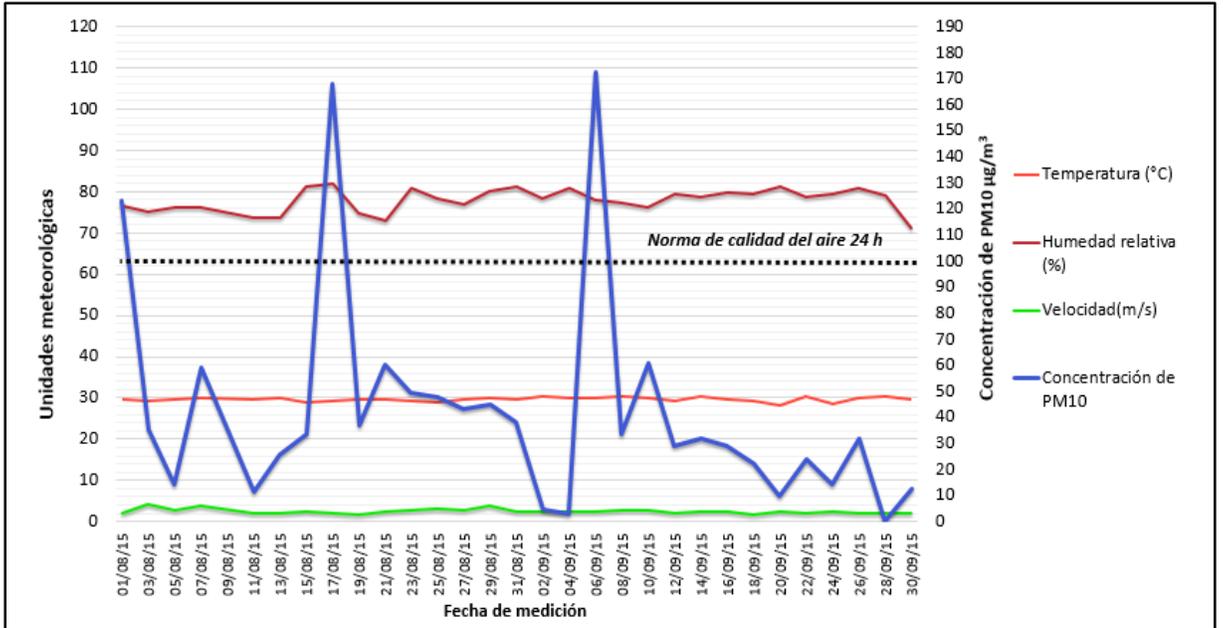


Figura 22. Relación entre variables meteorológicas (Agosto y Septiembre 2015), concentración de material particulado (PM10), y norma de calidad del aire en Colombia

En la Figura 22, se observan las fluctuaciones de las variables meteorológicas (temperatura, humedad relativa, velocidad del viento) a través del tiempo con respecto a la concentración de material particulado. La Figura 22 también incluye la norma de calidad del aire correspondiente a un valor de $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$

7. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Durante el periodo de muestreo, se observa baja variabilidad en los datos meteorológicos. Mientras que en términos de la concentración de PM10 se observa alta variabilidad (Figura 22). Lo anterior, puede ser explicado, a través de un cálculo de correlación lineal, entre las variables meteorológicas y la concentración de material particulado, como se presenta en la Figura 23.

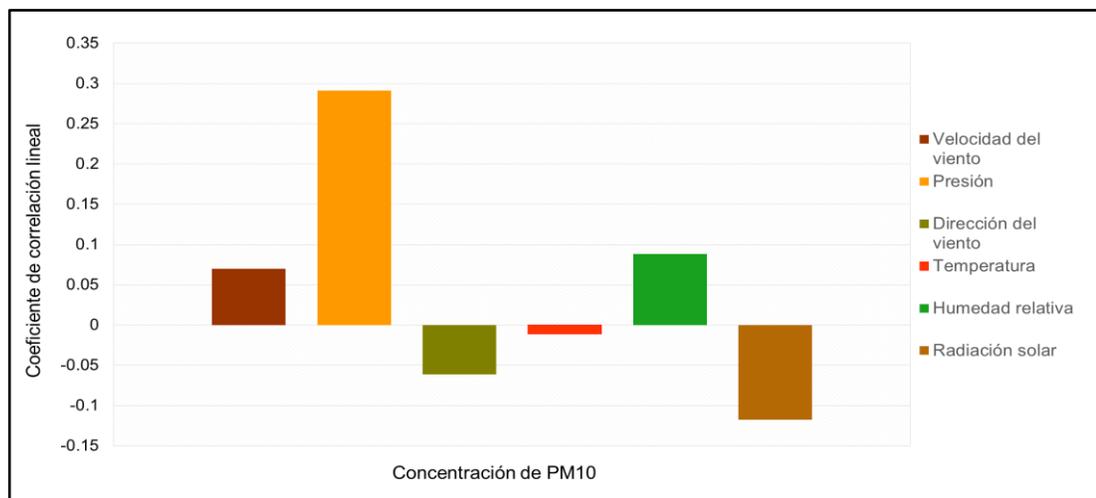


Figura 23. Correlación lineal de variables meteorológicas y concentración para los meses de Agosto y Septiembre de 2015.

Cada una de las barras representa el grado de asociación que hubo con las variables meteorológicas y la concentración de material particulado PM10. El coeficiente de correlación, cuantifica esta relación con valores comprendidos entre 1 (relación positiva o directamente proporcional) y -1 (relación negativa o inversamente proporcional) (Martínez et al., 2009). De acuerdo a esto, al observar la gráfica, los valores del coeficiente de correlación (r) se encuentran en un rango de -0.15 y 0.3, indicando que existe poca correlación entre las variables meteorológicas y la concentración de material particulado.

Lo anterior, indica que, posiblemente las altas concentraciones de material particulado no pueden ser explicadas por fenómenos meteorológicos puntuales. Estudios como los de Jones y Harrison (2004) y Vélez et al. (2010), afirman que la liberación de partículas aerotransportables se incrementan en días secos, conforme aumenta la temperatura y la velocidad del viento y se reduce la humedad relativa. Sin embargo, este comportamiento no fue posible verlo en este estudio dado que el periodo de muestreo fue corto.

En términos de calidad del aire, de los dos meses que fueron muestreados, 3 de los días excedieron la norma de calidad del aire ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) para un tiempo de exposición de 24 horas. La mayor concentración de material particulado se presentó el día 06/09/2015 con una concentración de $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Microbiológicamente, del total de las colonias de bacterias aisladas se identificó que el 92% de las muestras tomadas corresponden a bacterias Gram positivas y el 8% a bacterias Gram negativas. Este comportamiento se asemejó con los resultados obtenidos por Di Giorgio et al. (1996), en la identificación de bacterias en la Isla de Porquerolles, Francia, donde la incidencia de bacterias Gram positivas (80%), fue mayor a las bacterias Gram negativas (20%). Así mismo, en otro estudio, en la playa Tijuana, México, el 61% de las bacterias encontradas, correspondieron a Gram positivas y el 39% a bacterias Gram negativas (Hurtado et al., 2014). En Colombia, también se realizó la identificación de bacterias en un ambiente rural y se encontró que los microorganismos más predominantes fueron los Bacilos Gram positivos (Méndez et al., 2015). Esta tendencia de encontrar un mayor número de bacterias Gram positivas en el material particulado, se debe, probablemente a la constitución de su pared celular, que es más gruesa en comparación con la de las bacterias Gram negativas. Lo que les permite mayor capacidad de supervivencia en diferentes ambientes.

Por otra parte, las bacterias forman esporas, las cuales son metabólicamente menos activas y sobreviven mejor en la atmosfera. Algunas esporas tienen paredes gruesas que las protegen de la desecación, otras son pigmentadas, lo que las ayuda contra las radiaciones ultravioleta y su escasa densidad les permite permanecer suspendidas en el aire sin sedimentar (De La Rosa, Mosso, & Ullán, 2002).

La literatura indica que tanto en ambientes exteriores como interiores (hospitales, edificios, casa, escuelas), las bacterias del género *Bacillus* son las bacterias que se aíslan frecuentemente en el aire, como lo demuestran estudios realizados por (Rodríguez et al., 2005; Fang et al., 2007; Dybward et al., 2012; Okten y Asan, 2012; García et al., 2016), y las más predominantes, son las *Bacillus* Gram positivas (De la Rosa., 2002; Maldonado et al., 2014). Los *Bacillus* Gram negativos no son considerados microorganismos propios del aire (De la Rosa., 2002; Méndez et al., 2015).

Por otra parte, en este estudio se encontraron cinco especies de bacterias típicas de ambientes marinos: *Bacillus marisflavis* (68 UFC/mL), *Bacillus flexus* (9 UFC/mL), *Bacillus cohnii* (9 UFC/mL), *Bacillus sp* (22 UFC/mL), y *Bacillus spp*. Estas bacterias presentaron alto grado de resistencia al cloruro de sodio (50.000 a

300.000 ppm). Y el 100% fueron capaces de tolerar el perclorato de potasio en altas concentraciones (250 ppm hasta 1250 ppm) (Oren et al., 2014). Lo que las convierte en bacterias con potencialidades biotecnológicas, y que pueden ser empleadas en procesos de biorremediación de este contaminante.

Este trabajo concuerda con los resultados obtenidos por (Acevedo et al., 2016), en el cual, se caracterizó un grupo de bacterias del genero *Bacillus* Gram positivas provenientes de ambientes hipersalinos del Caribe colombiano, halófilas moderadas con potencialidades biotecnológicas para tolerar el perclorato de Potasio.

Adicionalmente, (Rainey, 2012; Agudelo y Castro, 2015), indicaron que *Bacillus spp* puede reducir el perclorato en condiciones aerobias, pueden tolerar altas concentraciones de perclorato y son capaces de reducirlo a una tasa de 71.04 mg/día por gramo de biomasa.

8. CONCLUSIÓN

Los resultados indicaron que del periodo muestreado el 10% de los días, excedieron la norma de calidad del aire para PM10. Los niveles más altos no pudieron ser explicados con fenómenos meteorológicos puntuales, como se demostró con el resultado del coeficiente de correlación lineal entre la concentración de PM 10 y las variables meteorológicas.

De las muestras analizadas, el 92% correspondieron a bacterias Gram Positivas y el 8% a bacterias Gram Negativas. El 100% de estas bacterias fueron positivas para las reacciones de oxidasa y catalasa, lo que indica, que todas las bacterias encontradas son aeróbicas. Este resultado era de esperarse dado que el medio donde se están transportando los bioaerosoles es el aire.

Del mismo modo, se identificaron los microorganismos presentes en el material particulado obteniendo un género: *Bacillus* y cinco especies de bacterias con sus respectivas unidades formadoras de colonias: *Bacillus marisflavis* (68 UFC/mL), *Bacillus flexus* (9 UFC/mL), *Bacillus cohnii* (9 UFC/mL), *Bacillus sp* (22 UFC/mL), y *Bacillus spp*. Este tipo de bacterias son típicas de ambientes marinos. No se evidenció presencia de bacterias patógenas en la Bocana durante la realización de esta investigación.

Estas bacterias presentaron alto grado de resistencia al cloruro de sodio (NaCl) (50.000 a 300.000 ppm) y fueron capaces de tolerar al perclorato de potasio (KClO₄) en concentraciones de 250 ppm a 1250 ppm. La tolerancia de las bacterias aisladas, expuestas a las altas concentraciones de NaCl y KClO₄, indica que pueden ser empleadas en procesos de biorremediación para degradar al perclorato de potasio, en los ecosistemas de Colombia. Estas bacterias tienen potencial para bioprospección, de acuerdo a lo reportado en la literatura por Acevedo et al. (2016).

La necesidad de identificar bacterias nativas surge del incipiente conocimiento sobre la diversidad microbiana de ambientes naturales con potencialidades biotecnológicas para degradar contaminantes ambientales; por lo tanto se constituyen como una fuente importante para la investigación en biorremediación. Los métodos biológicos existentes desarrollados en otros países tienen limitaciones, porque las cepas bacterianas utilizadas frecuentemente no se adaptan bien a las condiciones ambientales; reduciendo en muchos casos su capacidad degradadora y generar mayor impacto y deterioro de la calidad ambiental. Mientras que el uso de bacterias nativas no tendría problemas de adaptación y generarían menor impacto por ser propias de ese ecosistema.

9. TRABAJO FUTURO

Para el muestreo de bioaerosoles se recomienda usar el método de impactación, debido a que este permite contabilizar la cantidad de bacterias presentes en el aire. Si se cuenta de forma paralela con un equipo automático de alta resolución que permita medir la concentración de partículas en el aire, sería posible relacionar los resultados del impactador con la calidad del aire del sitio de estudio. Esto resultaría novedoso dado que en la literatura actual no se presentan este tipo de relaciones.

Las bacterias identificadas en este estudio son típicas de ambientes marinos, con capacidad de tolerar altas concentraciones de perclorato de potasio. Se sugiere realizar estudios que permitan determinar la potencialidad de degradación de este contaminante en las diferentes matrices ambientales de los ecosistemas de Colombia. Adicionalmente, estas bacterias pueden exponerse a concentraciones de otros contaminantes atmosféricos (hidrocarburos, metales pesados, entre otros) e investigar su capacidad bioremediadora de contaminantes.

No se evidenció presencia de bacterias patógenas responsables de enfermedades, por lo que se hace necesario realizar monitoreo permanente al menos en dos épocas diferentes del año (lluvia y sequía), para determinar si las poblaciones bacterianas de la Boquilla varían de una época a otra. Deben ampliarse los puntos y tiempos de muestreo en la ciudad de Cartagena, Bolívar y explorar con otros bioaerosoles (hongos, virus y polen) para determinar asociaciones de la calidad del aire y la presencia de enfermedades de interés en salud pública.

Finalmente, se hace necesario la realización de más estudios en la línea de bioaerosoles, debido a que, como se evidenció, en Colombia son pocos los estudios sobre la descripción e identificación de microorganismos presentes en el aire en espacios abiertos (aerobiología).

10. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, R., Bertel, A., Alonso, J., & Olivero, J. (2016). Perchlorate tolerant bacteria from saline environments at the Caribbean region of Colombia. *Toxicology Letters*, 259, S103.
- Adhikari, A., Reponen, T., Grinshpun, S., Martuzevicius, D., & LeMasters, G. (2006). Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone: a two-year study. *Environmental Pollution*, 16-28.
- Agudelo, M., & Castro, W. (2015). Caracterización de bacterias halófilas en el Caribe Colombiano con potencial capacidad degradadora de perclorato. Proyecto de grado. Universidad Tecnológica de Bolívar, Facultad de ingeniería, Cartagena de Indias.
- Alexis, N., Eldridge, M., & Peden, D. (2003). Effect of inhaled endotoxin on airway and circulating inflammatory cell phagocytosis and CD11b expression in atopic asthmatic subjects. *Journal of allergy and clinical immunology*, 353-361.
- Alexis, N., Lay, J., Zeman, K., Bennett, W., Peden, D., Soukup, J., y otros. (2006). Biological material on inhaled coarse fraction particulate matter activates airway phagocytes in vivo in healthy volunteers. *Journal of allergy and clinical immunology*, 1396-1403.
- Alonso, L., & Poveda, J. (2008). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petriflim™3M™ para el análisis de alimentos. Tesis de Pregrado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- Amaya, C., & Gutiérrez, N. (2004). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto etanólico del fruto Pacún. Tesis de Pregrado, Universidad de El Salvador, Facultad de química y farmacia, San Salvador.
- Anderson, G. (2003). *Marine Science: Seawater Composition*. Obtenido de <http://www.marinebio.net/marinescience/02ocean/swcomposition.htm>
- Apella, M., & Araujo, P. (2005). *Microbiología de agua. Conceptos básicos. Tecnologías Solares para la Desinfección y Descontaminación del Agua*, 33-50.
- Atlas, R., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid: Pearson Educación.
- Balasubramanian, R., Qian, W., Decesari, S., Facchini, M., & Fuzzi, S. (2003). Comprehensive characterization of PM2.5 aerosols in Singapore. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 108 (D16).
- Bernadette, R. (2005). *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. Ed. Médica Panamericana.

- Borrego, S., Pons, V., & Perdomo, I. (2008). La contaminación microbiana del aire en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba. *Centro Nacional de Investigaciones Científicas*, 118-137.
- Bovallius, A., Bucht, B., Roffey, R., & Anäs, P. (1978). Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, 35 (5), 847-852.
- Carnicer, J. (2007). Módulo I: Contaminación atmosférica. España: Escuela de Negocios España -EOI.
- Colls, J. (2002). *Air Pollution Second Edition, Shipping emissions*. Spon Press.
- Cox, C., & Wathes, C. (Edits.). (1995). *Bioaerosols handbook*. Lewis Publishers.
- De La Rosa, M., Mosso, M., & Ullán, C. (2002). El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio medioambiental*, 5, 375-402.
- Degobbi, C., Carvalho, R., Muñoz, E., Saldiva, P., & Lopes, F. (2011). Correlation of fungi and endotoxin with PM 2,5 and meteorological parameters in atmosphere of Sao Paulo, Brazil. *Atmospheric Environment*, 45, 2277-2283.
- Di Giorgio, C., Krempff, A., Guiraud, H., Binder, P., Tiret, C., & Dumenil, G. (1996). Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles. *Atmospheric Environment*, 30 (1), 155-160.
- Dimmick, R. L., Wolochow, H., & Chatigny, M. A. (1979). Evidence that bacteria can form new cells in airborne particles. *Applied and environmental microbiology*, (37)5, 924-927.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., & Heederik, D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. En *Annals of Occupational Hygiene* (Vol. 3, págs. 187-200).
- Dybwad, M., Granum, P., Bruheim, P., & Blatny, J. (2012). Characterization of airborne bacteria at an underground subway station. *Appl Environmental Microbiology*, 78, 1917-1929.
- Einarsdóttir, I., Silva, N., Power, D., Smaradottir, H., & Björnsson, B. (2006). Thyroid and pituitary gland development from hatching through metamorphosis of a teleost flatfish, the Atlantic halibut. *Anatomy and embryology*, 211 (1), 47-60.
- Ellington, J., & Evans, J. (2000). Determination of perchlorate at parts-per-billion levels in plants by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 898 (2), 193-199.

- EPA. (17 de June de 2016). United States Environmental Protection Agency. Obtenido de List of designated reference and equivalent methods: <https://www3.epa.gov/ttnamti1/files/ambient/criteria/reference-equivalent-methods-list.pdf>
- Fang, Z., Ouyang, Z., Zheng, H., Wang, X., & Hu, L. (2007). Culturable airborne bacteria in outdoor environments in Beijing, China. *Microbial Ecology*, 54, 487–496.
- Fisher, J., Todd, P., Mattie, D., Godfrey, D., Narayanan, L., & Yu, K. (2000). Preliminary development of a physiological model for perchlorate in the adult male rat: a framework for further studies. *Drug and chemical toxicology*, 23 (1), 243-258.
- Freeman, S. (2009). *Biología*. Pearson Addison Wesley.
- García, J., Murugesan, S., Pérez, A., García, M., Maya, O., Jacintol, M., y otros. (2016). Airborne Bacterial Diversity from the Low Atmosphere of Greater Mexico City. *Microbial ecology*, 1-15.
- Gobierno de Aragón. (2017). La calidad del aire en Aragón. Recuperado el 4 de Diciembre de 2017, de http://www.aragonaire.es/particulatematter.php?n_action=measure
- González, J., & Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol*, 44 (3-4), 137-156.
- Griffiths, W., & DeCosemo, G. (1994). The assessment of bioaerosols: A critical review. *Journal of Aerosol Science*, 25 (8), 1425-1458.
- Guardino, X. (2009). *Medición de contaminantes biológicos en aire*. Universitat Oberta de Catalunya.
- Henningson, E., & Ahlberg, M. (1994). Evaluation of microbiological aerosol samplers: A review. *Journal of Aerosol Science*, 25 (8), 1459-1492.
- Hinds, W. (1999). *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of airborne Particles*, 2.
- Hogue, C. (2003). Rocket-fueled river. *Environmental Pollution*, 81 (33), 37-46.
- Hughes, K. (2003). Aerial dispersal and survival of sewage derived faecal coliforms in Antarctica. *Atmospheric Environment*, 37, 3147-3155.
- Hurtado, L., Rodríguez, G., López, J., Castillo, J., Molina, L., Zavala, M., y otros. (2014). Characterization of atmospheric bioaerosols at 9 sites in Tijuana, Mexico. *Atmospheric Environment*, 96, 430-436.
- IGAC. (2017). *Bocana Estabilizada*. Cartagena, Colombia.

- INSHT. (2001). NTP 608: Agentes biológicos: planificación de la medición. (pág. 11). España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
- INSHT. (2001). NTP 609: Agentes biológicos: equipos de muestreo (I). (pág. 11). España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
- IPCC. (2013). Glosario. En S. Planton (Ed.), Cambio Climático 2013. Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. Cambridge University Press.
- Jensen, P., Lighthart, B., Mhor, A., & Shaffer, B. (1994). Atmospheric microbial aerosols: theory and applications. En P. Eller, & M. Cassinelli (Edits.), NIOSH Manual of Analytical Methods: Instrumentation used with microbial bioaerosol (Cuarta ed., págs. 83-112). Cincinnati, Ohio.
- Jiménez, T., & Vélez, A. (2012). Microbiología: Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. *Medicina & Laboratorio*, 18 (11-12), 16.
- Jones, A., & Harrison, R. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations a review. *Science of The Total Environment*, 151-180.
- Jones, B., & Cookson, J. (1983). Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (3), 919-934.
- Kalogerakis, N., Paschali, D., Lekaditis, V., Pantidou, A., Eleftheriadis, K., & Lazaridis, M. (2005). Indoor air quality bioaerosol measurements in domestic and office premises. *Journal of Aerosol Science*, 36, 751-761.
- Kersters, K., & Vancanneyt, M. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
- Kirk, A., Smith, E., Tian, K., Anderson, T., & Dasgupta, P. (2003). Perchlorate in milk. *Environmental Science & Technology*, 37, 4979-4981.
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Médica Panamericana.
- Lacey, J., & Venette, J. (1995). Outdoor air sampling techniques. *Bioaerosols handbook*, 407-471.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 3 (1), 10-18.
- Madigan, M., & Mairs, B. (1997). Extremophiles. *Scientif American*, 82-87.

- Magiar. (2016). Medios de cultivo: Cromogénicos. Recuperado el 2017 de Enero de 2, de Productos Químicos Magiar S.A. : <http://magiar.com.ar/seguridad-alimentaria/microbiologia-general-2/medios-de-cultivo/cromogenicos/>
- Maldonado, M., Peña, J., De Los Santos, S., Castellanos, A., Camarena, D., Arevalo, B., y otros. (2014). Bioaerosoles y evaluación de la calidad del aire en dos centros hospitalarios ubicados en León, Guanajuato, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30 (4), 351-363.
- Maldonado, W., Baldiris, I., & Diaz, J. (2011). Evaluación de la calidad del agua en la Ciénaga de la Virgen (Cartagena, Colombia) durante el período 2006-2010*. *Revista Científica Guillermo de Ockham.*, IX (2), 79-87.
- Martínez, R., Tuya, L., Martínez, M., Pérez, A., & Cánovas, A. (2009). El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana (ISCM-H) , Facultad de Ciencias Médicas Dr. Enrique Cabrera .
- MAVDT. (2010). Protocolo para el monitoreo y seguimiento de la calidad del aire: Manual de diseño de los sistemas de vigilancia de la calidad del aire. Bogotá D.C: Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial.
- MAVDT. (2010). Resolución 601 de 2010. Norma de Calidad del Aire o Nivel de Inmisión, para todo el territorio nacional en condiciones de referencia. (pág. 6). Bogotá D.C: Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.
- Méndez, C., Camacho, J. G., & Echeverry, S. (2015). Identification of bacteria and fungi in the air of Neiva. *Revista de Salud Pública*, 17 (5).
- Miwa, S., & Inui, Y. (1987). Effects of various doses of thyroxine and triiodothyronine on the metamorphosis of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *General and comparative endocrinology*, 67 (3), 356-363.
- Motzer, W. (2001). Perchlorate: problems, detection, and solutions. *Environmental Forensics*, 2 (4), 301-311.
- Mueller, L., Avol, E., Peters, J., & Thorne, P. (2004). Ambient endotoxin concentrations in PM10 from Southern California. *Environmental health perspectives* , 583-588.
- Murray, C., & Bolger, P. (2014). *Environmental Contaminants: Perchlorate* . (Y. Motarjemi, Ed.) Waltham: Academic Press.
- Nevalainen, A., Pastuszka, J., Liebhaber, F., & Willeke, K. (1992). Performance of bioaerosol samplers: collection characteristics and sampler design considerations. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 26, 531–540.

- Okten, S., & Asan, A. (2012). Airborne fungi and bacteria in indoor and outdoor environment of the Pediatric Unit of Edirne Government Hospital. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 1739–1751.
- Oren, A., Bardavid, R., & Mana, L. (2014). Perchlorate and halophilic prokaryotes: implications for possible halophilic life on Mars. *Extremophiles*, 18 (1), 75-80.
- Peña, R. (2014). Lineamientos de gestión ambiental pública para la sustentabilidad del proyecto bocana estabilizada ubicado en el Distrito de Cartagena de Indias. Tesis Postgrado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de estudios ambientales y rurales , Bogotá, D.C.
- Quevedo, A. (2005). Diccionario didáctico de ecología. Editorial Universidad de Costa Rica. Universidad de Costa Rica.
- Rainey, F. (2012). Unpublished work. *Extremophiles: 9th International Congress*. Sevilla, España.
- Ramírez, N., Sandoval, A., & Serrano, J. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24 (1-2), 12-23.
- Rodríguez, S., Sauri, M., Peniche, I., Pacheco, J., & Ramírez, J. (2005). Aerotransportables viables en el área de tratamiento y disposición final de residuos sólidos municipales de Mérida, Yucatán. *Ingeniería*, 9, 19-29.
- Roger Y. Stanier, . R. (1996). *Microbiología, Estructuras superficiales de la célula procariótica* (Segunda ed.). Ed. Reverte.
- Rojas, N. (2005). *Material particulado atmosférico y salud*. Universidad de los Andes, Facultad de ingeniería. Bogotá: Centro de Investigaciones.
- Roldán, E. C. (2003). Determinación de la calidad microbiológica del aire en una industria textil. *Revista Latinoamericana de Salud en el Trabajo*, 3 (1), 21-24.
- Rosas, I., Salinas, E., Martínez, L., Eslava, C., & Cravioto, A. (2004). *Microbiología ambiental: Bacterias en la atmósfera*. 134.
- Rothschild, L., & Manicinelli, R. (2001). Life in extreme environments . *Nature* , 1092-1101.
- Ryu, H., Nor, S., Moon, K., Cho, K., Cha, D., & Rhee, K. (2012). Reduction of perchlorate by salt tolerant bacterial consortia. *Bioresource technology*, 103 (1), 279-285.

Salminen, K., & Karlsson, V. (2003). Comparability of low-volume PM10 sampler with β -attenuation monitor in background air. *Atmospheric Environment*, 37 (26), 3707–3712.

Sbarato, V., Basan, R., Manzo, P., Salort, M., & Campos, M. (2000). *Análisis y Caracterización del Material Particulado Atmosférico*. Universidad Nacional de Córdoba, Maestría en Gestión para la Integración Regional y Centro de Información y Documentación Regional, Ciudad de Córdoba.

Science Learning Hub. (22 de June de 2010). Ocean Salinity. Obtenido de <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/686-ocean-salinity>

Shi, Y. (2000). *Amphibian Metamorphosis: from Morphology to Molecular Biology*. . Wiley-Liss, New York: Chichester.

Srivastava, A., Singh, M., & Jain, V. (2012). Identification and characterization of size-segregated bioaerosols at Jawaharlal Nehru University, New Delhi. *Natural hazards*, 60 (2), 485-499.

Thrash, J., Van Trump, J., Weber, K., Miller, E., Achenbach, L., & Coates, J. (2007). Electrochemical stimulation of microbial perchlorate reduction. *Environmental science & technology*, 41 (5), 1740-1746.

Tormo, R. (2009). *Aerobiology: Pollens and Spores in the Air*. University of West Scotland, Paisley.

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología* (Novena ed.). Buenos aires, Argentina : Editorial Médica Panamericana.

Underwood, E. (1997). Ecology of microorganisms as it affects the pharmaceutical industry. (W. Hugo, & A. Rusell, Edits.) *Pharmaceutical microbiology* .

Urbansky, E., Brown, S., Magnuson, M., & Kelty, C. (2001). Perchlorate levels in samples of sodium nitrate fertilizer derived from Chilean caliche. *Environmental Pollution*, 112 (3), 299-302.

US EPA. (2016). Particulate Matter (PM) Pollution Protection Agency. (U. S. Environmental, Editor) Recuperado el 2 de Enero de 2017, de <https://www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics#PM>

US EPA. (17 de June de 2016). United States Environmental Protection Agency. Obtenido de List of designated reference and equivalent methods: <https://www3.epa.gov/ttnamti1/files/ambient/criteria/reference-equivalent-methods-list.pdf>

- Velasco, C. (2015). Contaminantes generados en la exploración y explotación minera, métodos de análisis y sus efectos ambientales. Tesis , Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de ciencias exactas y naturales, Quito.
- Vélez, A., Caicedo, Y., & Rincones, S. (2010). Distribución espacio-temporal de aerobacterias en el relleno sanitario palangana, Santa Marta (Colombia). *Intropica*, 5, 7-18.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., y otros (Edits.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (2, ilustrada ed.). Springer Science & Business Media, 2011.
- Wallace, W., Ward, T., Breen, A., & Attaway, H. (1996). Identification of an anaerobic bacterium which reduces perchlorate and chlorate as *Wolinella succinogenes*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 16 (1), 68-72.
- Waller, A., Cox, E., & Edwards, E. (2004). Perchlorate-reducing microorganisms isolated from contaminated sites. *Environmental Microbiology*, 6 (5), 517-527.
- Wang, L., Wanjura, J., Parnell, B., Lacey, R., & Shaw, B. (2005). American Society of Agricultural and Biological Engineers -ASABE. Obtenido de Performance characteristics of a low-volume PM10 sampler: <https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=18316&t=2&redir=&redirType=>
- Wolff, J. (1998). Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacological reviews*, 50 (1), 89-106.

11. ANEXOS

1. Descripción del área de estudio.

La Bocana estabilizadora de mareas es un canal artificial entre el mar Caribe y la Ciénega de la Virgen atravesado por la Vía al Mar o Anillo Vial que comunica las ciudades de Cartagena y Barranquilla (Maldonado et al., 2011; Peña, 2014). Esta construcción se realizó para permitir un mayor volumen de intercambio de una forma controlada entre el mar y la ciénega, con el objeto de que el agua del mar diluyera el de la Ciénega y mejorara a corto plazo los niveles de oxigenación y salinidad (Maldonado et al., 2011). Este proyecto comenzó a funcionar en el año 2000 con el fin de purificar y limpiar el agua de la Ciénega de la Virgen y el sistema de caños, que venían sufriendo grandes daños ecológicos, debido a que se habían convertido en el lugar de descarga de las aguas residuales de la ciudad (Peña, 2014). Actualmente, se encuentra administrada por la autoridad ambiental urbana del Distrito de Cartagena el Establecimiento Público Ambiental (EPA), sin embargo, quien ejerce jurisdicción en esta zona es la Corporación Autónoma Regional del Canal del Dique (CARDIQUE).

En la Figura se muestra la ubicación de la Bocana, lugar donde se realizaron las campañas de monitoreo de material particulado (PM10).



Figura 24. Ubicación de los equipos de monitoreo de calidad del aire en la Bocana
Fuente: (IGAC, 2017).

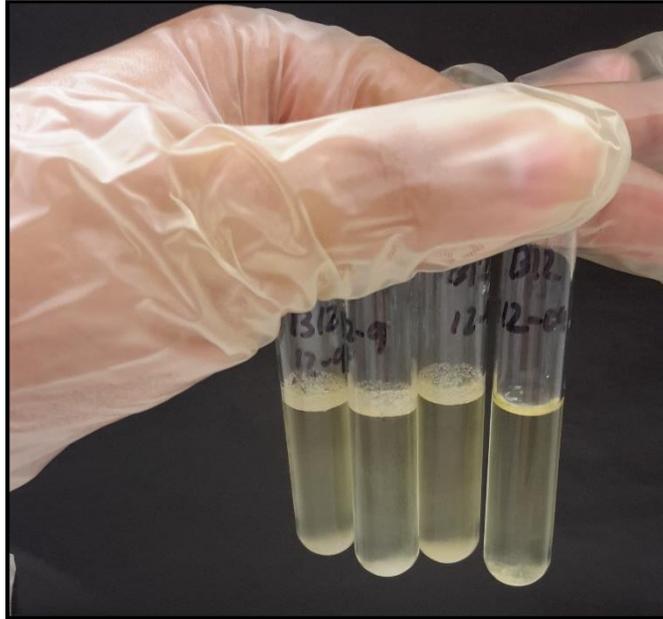
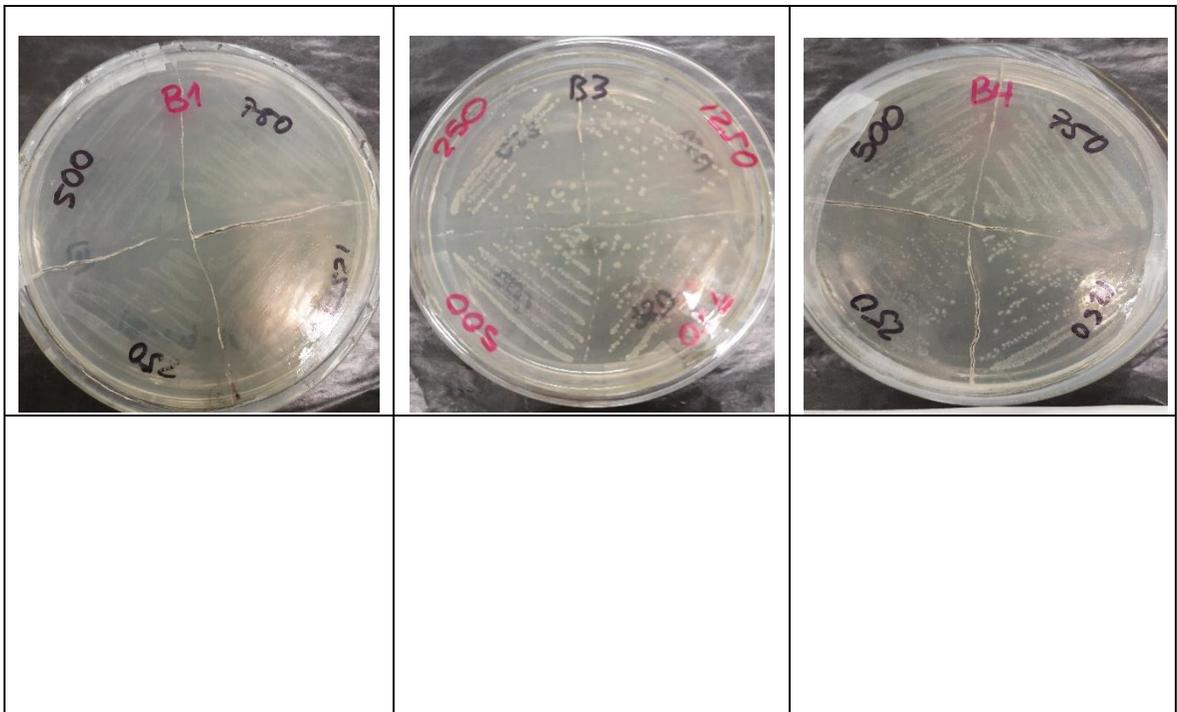


Figura 25. Ensayos de susceptibilidad al perclorato B12. Formación de biopelículas



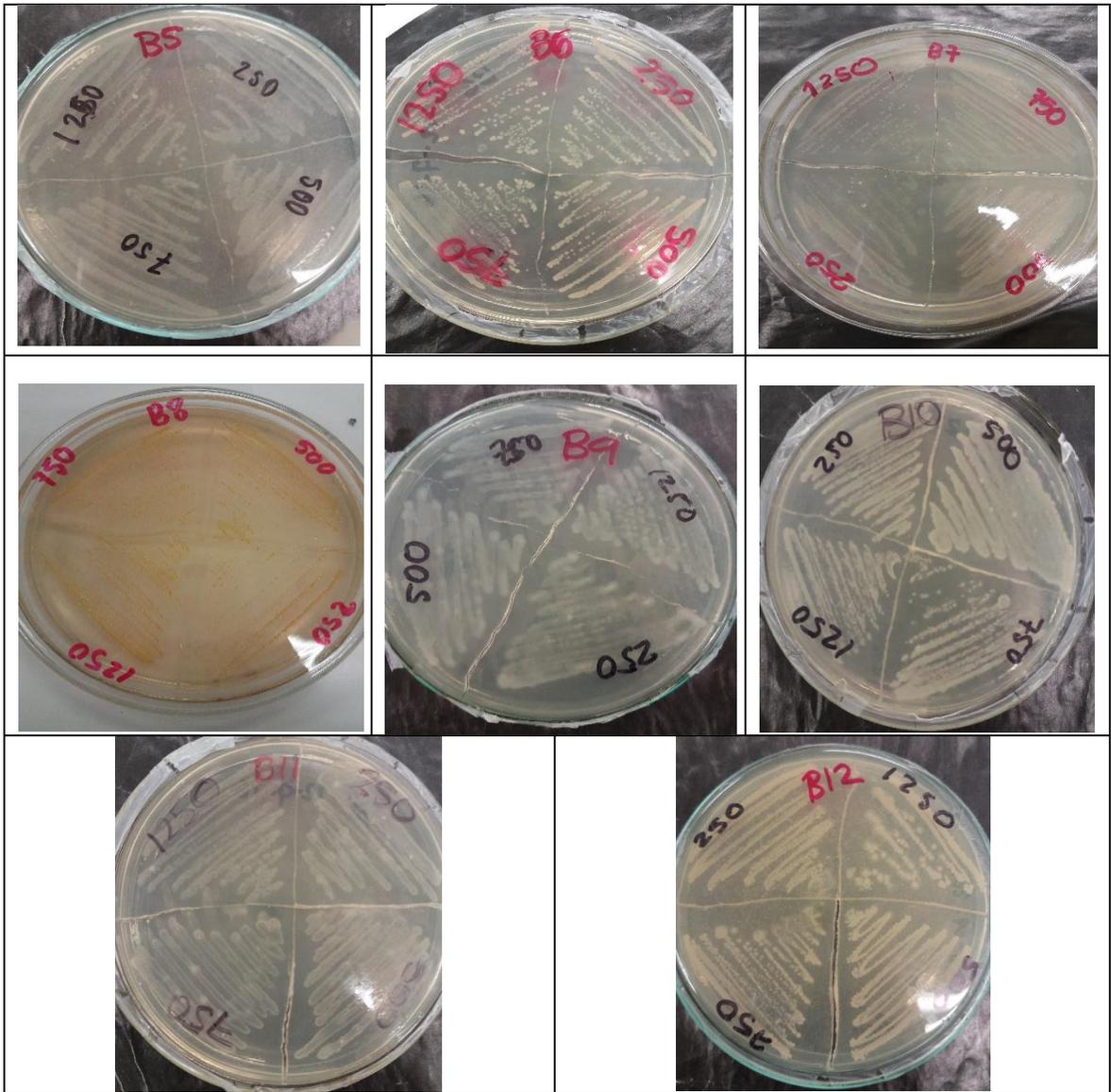


Figura 26. Ensayos de susceptibilidad al perclorato



Figura 27. Morfología cepa b03, a través de LBX Zoom Stereo Microscope



Figura 28. Muestreo de material particulado en la bocana

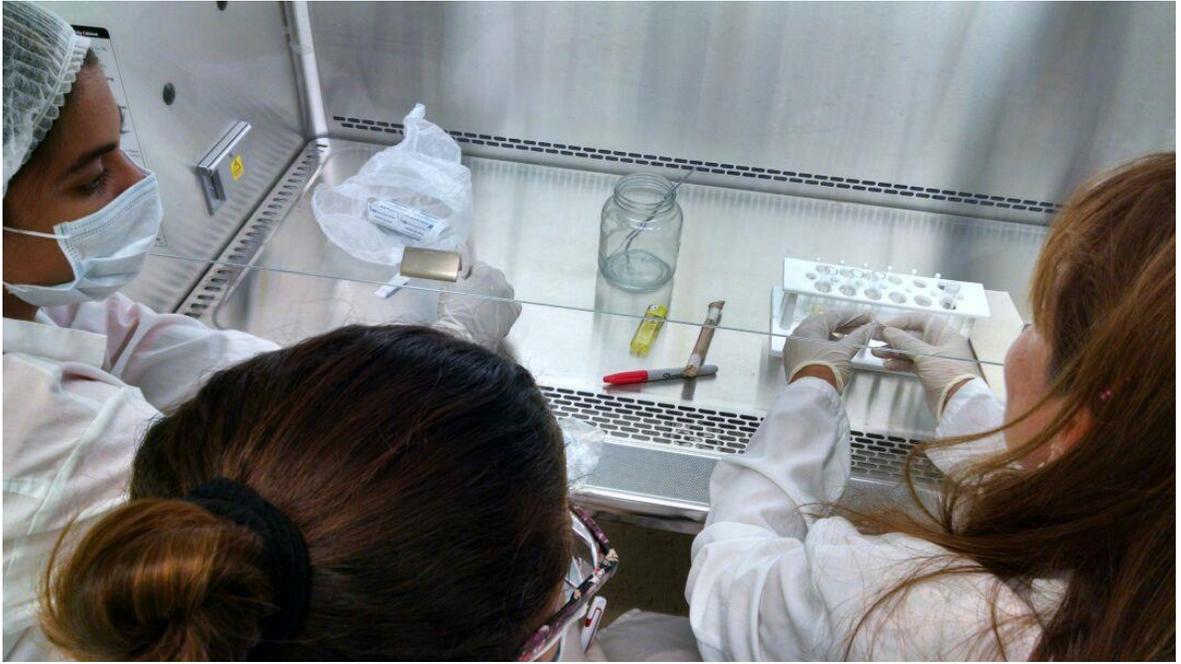


Figura 29. Ensayos de análisis microbiológicos