



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE ORIGEN AMBIENTAL
POR MALDI-TOF MS**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

IVÁN ARVIZU HERNÁNDEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., MAYO DE 2016



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología**

**Aislamiento e identificación de bacterias de origen ambiental por
MALDI-TOF MS**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Iván Arvizu Hernández

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

SINODALES

Dr. Juan Campos Guillén
Presidente

Firma

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Secretario

Firma

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez
Vocal

Firma

Dr. Andrés Cruz Hernández
Suplente

Firma

M. en C. Xóchitl Pastrana Martínez
Suplente

Firma

RESUMEN

La implementación de un programa de monitoreo ambiental en un laboratorio de bioseguridad nivel 2 fue evaluado en una industria multinacional de productos cosméticos en el Estado de Querétaro, México. Un total de seis sitios fueron monitoreados en las instalaciones y se recogieron muestras microbiológicas. 19 géneros bacterianos fueron identificados por espectrometría de masas con desorción y ionización láser por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) y por secuencias de ácido desoxirribonucleico ribosomal (rDNA) 16S. Con el fin de determinar la asociación entre géneros bacterianos y la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos, nueve antibióticos con diferentes blancos intracelulares fueron probados. Los resultados mostraron que bacterias *Gram* negativas, tal como *Pseudomonas sp.* y *P. perfectomarina* fueron altamente resistentes a todos los antibióticos probados, al igual que las especies *Gram* positivas, *Staphylococcus cohnii* y *S. xylosus*. Estos resultados sugieren fuertemente que las bacterias resistentes a múltiples fármacos deben ser un área de preocupación para este programa de monitoreo ambiental y más esfuerzos son necesarios para comprender los procesos y medidas de gestión de riesgos.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, MALDI-TOF MS, laboratorio nivel II de bioseguridad, bacterias ambientales, industria cosmética

SUMMARY

The implementation of an environmental monitoring program in a level 2 biosafety laboratory was evaluated in a multinational manufacturer of personal care products in Querétaro State, México. A total of six sites were monitored in the facility and microbiological samples were collected. Nineteen bacterial genera were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and by 16S ribosomal deoxyribonucleic acid (rDNA) sequences. In order to determine the association between bacterial genus and the presence of antibiotic resistance determinants, nine antibiotics with different intracellular targets were tested. The results showed that Gram negative bacteria, such as *Pseudomonas sp.* and *P. perfectomarina* were highly resistant to all the antibiotics tested, as were the Gram positive species, *Staphylococcus cohnii* and *S. xylosus*. Our results strongly suggest that multidrug resistant bacteria should be an area of concern for this environmental monitoring program and more efforts are necessary to understand processes and risk management measures.

Keywords: multi-drug resistance, MALDI-TOF mass spectrometry, level 2 biosafety laboratory, environmental bacteria; multinational manufacturer.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la vida y llenarme de bendiciones siempre.

*A mi madre Verónica, por su apoyo incondicional en mi crecimiento personal
y profesional.*

*A mi tío Jorge, por sus innumerables consejos y apoyo desde niño y por
enseñarme que el estudio abre más oportunidades en la vida.*

*A mis hermanos Christian y Emily, por ser la alegría de mi vida y mis motivos
para ser mejor cada día.*

A mi tía Rosa y a mis primas Karen y Roseanne.

A mis abuelos Abel y Soledad, porque por ustedes existe nuestra familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Dr. Juan Campos Guillén, por haber puesto su confianza en mi persona para la realización de este proyecto y por siempre brindarme apoyo en su laboratorio y abrirme oportunidades de desarrollo académico.

Al Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez, por sus valiosas aportaciones en el mejoramiento del escrito y del trabajo en sí.

Al Dr. Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez, por su disponibilidad en la revisión del trabajo.

Al Dr. Andrés Cruz Hernández, por aceptar estar dentro del mis asesores, y por su colaboración en el proyecto.

A la M. en C. Xóchitl Pastrana Martínez, por la revisión de escrito, y aceptar ser suplente dentro de los sinodales.

Al M. en C. Julio Cruz, por sus consejos en la experimentación y por su ayuda en laboratorio, un buen amigo.

A los programas FOVIN 2014, por el financiamiento del proyecto.

Al Ing. Demetrio Pérez, por brindarnos las muestras de aire, material de cultivo y por confiar en nuestro grupo de trabajo para el diagnóstico microbiano.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por ser una casa para mi estudio y desarrollo personal e interpersonal y por “*educarme en la verdad y en el honor*”

TABLA DE CONTENIDOS

Apartado	Pág.
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	V
ÍNDICE DE TABLAS	Vii
ÍNDICE DE FIGURAS	Vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 DIVERSIDAD MICROBIANA EN EL AIRE.....	3
2.1.1 LA IMPORTANCIA DEL MONITOREO AMBIENTAL.....	4
2.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN BACTERIANA.....	5
2.2.1 MALDI-TOF MS.....	5
2.2.2 ANÁLISIS DE RDNA 16S.....	8
2.3 RESISTENCIA BACTERIANA A FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS.....	11
2.3.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	13
2.3.2 DIFUSIÓN DE LA RESISTENCIA.....	16
2.3.2.1 TRANSFORMCIÓN.....	19
2.3.2.2 CONJUGACIÓN.....	20
2.3.2.3 TRANSDUCCIÓN.....	20
2.4 EL AMBIENTE COMO RESERVORIO DE REISTENCIA.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24

5. OBJETIVOS	25
5.2 OBJETIVO GENERAL.....	25
5.3 OBJETIVO PARTICULAR.....	25
6. MÉTODOS	26
6.1 MUESTREO AMBIENTAL.....	26
6.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	26
6.3 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA POR MALDI-TOF MS.....	26
6.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR POR SECUENCIACIÓN DE RDNA 16S (SSU).....	27
6.4.1 EXTRACCIÓN DE DNA, PCR Y SECUENCIACIÓN.....	27
6.4.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.....	28
6.5 ANÁLISIS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	28
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
7. RESULTADOS	30
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	46
10. PERSPECTIVAS	47
11. REFERENCIAS	48
12. APÉNDICE 1	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Mecanismos generales de resistencia a los agentes antibacterianos.....	15
Tabla 2 Elementos genéticos móviles.....	18
Tabla 3 Antibióticos usados en las pruebas de resistencia.	29
Tabla 4 Identificación de las cepas totales aisladas.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fuentes de aislamiento de nuevas especies.....	4
Figura 2 Representación esquemática de un operón de rRNA.....	9
Figura 3 Factores que influyen en el desarrollo de resistencia bacteriana a antibióticos.....	13
Figura 4 Mecanismos de adquisición de la resistencia.....	19
Figura 5 Composición del perfil microbiano en los sitios de muestreo.....	32
Figura 6 Prevalencia relativa en los sitios de muestreo.....	33
Figura 7 <i>Heat map</i> del perfil de respuesta a antibióticos de las cepas probadas.....	35
Figura 8 Efecto de inhibición de los antibióticos y las cepas probadas.....	37

APÉNDICES

Apéndice 1:

Tabla 1 Caracterización fenotípica de colonias.....	72
--	----

Apéndice 2:

Niveles de bioseguridad en los laboratorios microbiológicos.....	73
--	----

1. INTRODUCCIÓN

El ambiente alberga una gran diversidad microbiana, entre las cuales se encuentran bacterias patógenas que han representado un riesgo potencial para las actividades humanas. Diversos estudios de muestras de aire en ambientes cerrados revelan que la diversidad de microorganismos y su resistencia a los antibióticos son de particular interés, debido al riesgo de enfermedad o infección durante la exposición a ciertos niveles de los contaminantes microbianos (Gálvez-Martín et al., 2012; Leung and Chan, 2006; Papadopoulou et al., 2008; Scaltriti et al., 2007).

Estudios revelan que muchos trabajadores gastan hasta el 88% de su jornada de trabajo en espacios cerrados, y los niveles de contaminantes del aire pueden ser varios cientos de veces más altas durante las horas de trabajo que en otras ocasiones, especialmente en los edificios públicos, tales como hospitales, escuelas, oficinas e instalaciones industriales (Jones, 1999; Pasquarella et al., 2000). En este sentido, la oportuna detección y caracterización microbiana es importante en la transmisión de enfermedades. Por lo anterior es importante el desarrollo de programas de monitoreo ambiental usando métodos avanzados de identificación bacteriana de una manera rápida y confiable y que además represente un costo menor que los análisis microbianos tradicionales, para evaluar y gestionar los riesgos de la exposición a agentes biológicos dentro de los edificios (Fox et al., 2010; Wimmer et al., 2012).

Diversos trabajos de monitoreo ambiental como por ejemplo en hospitales, la industria y espacios públicos han aislado cepas resistentes a múltiples fármacos antimicrobianos. De las bacterias más comunes y que son aisladas con relativa frecuencia esta *Staphylococcus aureus*, que posee la característica de ser Meticilina resistente y patógena oportunista implicada en muchos procesos infecciosos (Boyce et al., 1997; Lemmen et al., 2004; Sergent et al., 2012; Tan et al., 2013), por otra parte, se han evaluado aislados ambientales en los que se ha encontrado que en el aire de espacios cerrados, las bacterias se pueden liberar directamente de sus ocupantes, tales como *Staphylococcus sp.* y *Micrococcus luteus*.

Un área importante para salud pública es la incidencia de resistencia a antibióticos entre diferentes cepas de bacterias patógenas oportunistas aisladas de diferentes fuentes, y esta incidencia no solo representa un problema para el ambiente clínico hospitalario, sino que también involucra una gran variedad de ambientes como la industria cosmética (Levy and Marshall, 2004). Es importante entonces conocer metodologías que permitan una identificación rápida y acertada de aislados de diferentes fuentes. Se sabe que el ambiente juega un papel importante como reservorio de factores de resistencia y representa una fuente para su difusión entre cepas aún con sensibilidad (Messi et al., 2015).

En la década pasada, al menos los laboratorios de microbiología clínica, experimentaron cambios que revolucionaron la manera en que los microorganismos son identificados, alejándose de los lentos algoritmos de identificación microbiana tradicionales hacia métodos moleculares rápidos y Espectrometría de Masas (MS). La técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*), ha ganado más y más importancia en la identificación de bacterias (Veloo et al., 2011). Tiene el potencial para distinguir entre especies de bacterias patógenas y no patógenas, además, el espectro de masas obtenido de una muestra de bacterias no conocidas puede ser usado para la comparación con librerías de referencia de organismos conocidos para una correcta identificación (Krishnamurthy and Ross, 1996; Krishnamurthy et al., 1996).

Este estudio muestra que la identificación exacta de especies bacterianas es crítica, no solo para el mantenimiento de programas de monitoreo ambiental, sino también para mitigar el riesgo presentado por los organismos resistentes a antibióticos en ambientes cerrados. Por lo que en este trabajo se implementó el método de MALDI-TOF MS para la identificación de bacterias y adicionalmente se se caracterizó la resistencia a antibióticos de las mismas. Los géneros bacterianos importantes encontrados como contaminantes del aire del laboratorio de bioseguridad nivel 2 fueron *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, quienes presentaron altos niveles de resistencia a los antibióticos probados. *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus* fueron las bacterias encontradas más frecuentemente

en los sitios de muestreo, las cuales han sido relacionadas fuertemente con procesos infecciosos severos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diversidad microbiana en el aire

La diversidad microbiana del aire es amplia, la revista *Astrobiology* en 2006, enumera que existen más de 1,800 tipos de bacterias. El equipo de investigación utilizó métodos de análisis de microarreglos de DNA para hacer la tipificación bacteriana de muestras de aire tomadas de las ciudades de San Antonio y Austin en Texas. Ellos encontraron una diversidad sorprendente, que incluso podría competir con la diversidad encontrada en suelos. En esta diversidad encontraron bacterias con capacidades de ser usadas en bioterrorismo y cepas inofensivas (Brodie et al., 2007).

La base de datos *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* (LPSN, 2016), muestra datos acerca de las fuentes de aislamiento de nuevas especies descritas entre julio de 2013 y junio de 2014 **Figura 1**, los cuales muestran que de 900 especies descritas, al menos el 63% han sido aisladas de fuentes ambientales como el suelo, aguas marinas, agua dulce y otros ambientes como el aire. También se muestra que solamente el 7% se aisló de fuentes industriales.

En el aire de diversos espacios cerrados se ha descrito que la contaminación biológica es principalmente por bacterias y hongos. Se han aislado especies como *Micrococcus sp.*, *M. luteus*, *Staphylococcus aureus* (Bonetta et al., 2010; Fox et al., 2010; Hayleeyesus and Manaye, 2014), *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus sp.* y *Neisseria sp.* (Hayleeyesus and Manaye, 2014), *Klebsiella sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marscencens* (Awosika et al., 2012).

La mayor parte de la investigación sobre la distribución y propagación de cepas de bacterias *Gram* positivas y *Gram* negativas que se encuentran en

muestras de aire de interiores, se ha centrado en métodos eficaces para la clasificación e identificación de las cepas (Fox et al., 2010; Wimmer et al., 2012).

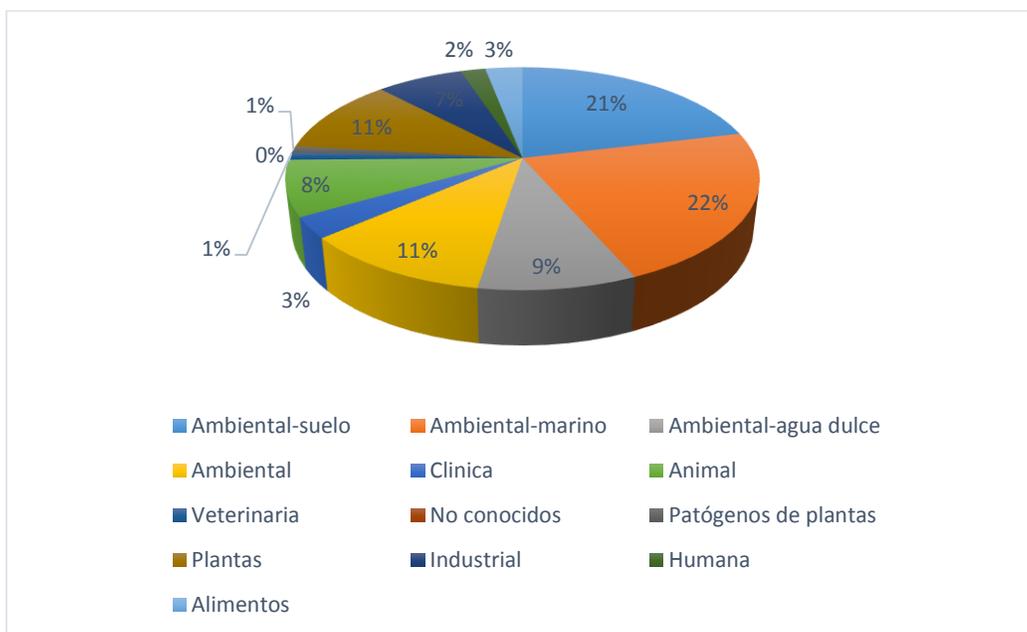


Figura 1| Fuentes de aislamiento de nuevas especies. Porcentajes de especies descritas durante un año, julio de 2013 a junio de 2014. Tomado y modificado a partir de la base de datos *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* (LPSN, 2016).

2.1.1 La importancia del monitoreo ambiental en la industria cosmética

En muchas actividades humanas los microorganismos en el ambiente representan riesgos a menudo ocultos. En este sentido se ha incrementado la introducción de tecnologías y métodos de cuantificación del nivel de contaminación microbiana en hospitales, la industria, la agricultura, entre otros (Pasquarella et al., 2000). El conteo de colonias microbianas por metro cúbico de aire (ufc/m³), es un método de uso frecuente para evaluar la calidad microbiana.

Los microorganismos suspendidos en el aire pueden ser patógenos oportunistas, por lo que en el control microbiano industria cosmética se debe incluir a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y otros microorganismos potencialmente patógenos (Budecka and Kunicka-Styczyńska, 2014). Se ha observado que los microorganismos presentes en los flujos de aire están relacionados directamente con la contaminación de las

superficies (Pasquarella et al., 2000). Las actividades microbiológicas estándar que implican microorganismos infecciosos, deben llevarse a cabo en un laboratorio de bioseguridad para reducir al mínimo el riesgo de contaminación. Control y gestión del laboratorio de bioseguridad de nivel 2 (Ver Apéndice 2), son necesarios para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación microbiana del ambiente circundante y de los productos cosméticos (Adelberg et al., 1989).

Los microorganismos con resistencia a múltiples fármacos, pueden ser útiles como indicadores de riesgo potencial para la salud durante un programa de vigilancia ambiental, proporcionando así, un depósito masivo de información genética con importantes implicaciones para la transferencia de determinantes de resistencia a múltiples fármacos en las bacterias oportunistas. La caracterización microbiana es importante para los programas de monitoreo ambiental, para garantizar el mantenimiento de condiciones aceptables de calidad del aire. Más esfuerzos son necesarios para entender los procesos y medidas de gestión de riesgos.

2.2 Métodos de detección microbiana

En la actualidad, la emergencia de microorganismos patógenos es de particular importancia en salud pública. Nuevos enfoques y el uso de metodologías han permitido que nuevas estrategias de detección microbiana en el área de microbiología ambiental puedan mantenerse a la vanguardia en el área de diagnóstico.

2.2.1 MALDI-TOF MS

Las plataformas comercializadas hasta el momento utilizan la Espectrometría de Masas (EM) para la identificación de microorganismos, que mediante dos aproximaciones diferentes: la identificación basada en el perfil proteico específico de cada microorganismo (aproximación proteómica), o el análisis de sus ácidos nucleicos (aproximación genómica) (Gelpi, 2008; Jurinke et al., 2004).

La EM fue concebida hace más de cien años. Sin embargo, no fue hasta la invención de las llamadas técnicas de ionización suave MALDI (por las siglas en inglés de *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) y ESI (por las siglas en inglés de *Electrospray Ionization*), que esta tecnología empezó a utilizarse en los laboratorios para aplicaciones rutinarias (Gelpi, 2008). Estas técnicas de ionización suave permitieron el análisis de proteínas de elevado peso molecular y a la vez facilitaron el análisis de mezclas, ya que mediante estas técnicas, los componentes de una mezcla compleja se ionizan sin sufrir apenas fragmentaciones, lo cual simplifica los espectros de masas (Abonnenc et al., 2010; Duncan et al., 2008; Lay Jr. and Holland, 2000). En los últimos 20 años, estas nuevas técnicas de EM se convirtieron en indispensables para el avance de la proteómica, sobre todo al ser combinadas con el analizador de masas tipo TOF (por sus siglas en inglés de *Time-Of-Flight*). Aunque la separación de partículas cargadas basada en la masa y el tiempo de vuelo se conoce desde el 1897, la utilización del tiempo de vuelo como medio para obtener un espectro de masas tardó en aplicarse en la EM, y fue en 1946 cuando apareció la primera referencia de su empleo. El MALDI-TOF se utilizaba inicialmente para el análisis cualitativo de biopolímeros, como una herramienta para valorar la pureza de diferentes productos. Debido a las características técnicas de los primeros espectrómetros de tipo MALDI, su utilización para el análisis de analitos de bajo peso molecular resultaba inapropiada debido a que el exceso de matriz enmascaraba la señal de estos. Además, resultaba difícil obtener una aproximación cuantitativa, debido a que la cristalización de la matriz no era uniforme, por lo que se obtenían señales de diferente intensidad según la zona. Actualmente ya no se tienen estos inconvenientes, es una técnica ampliamente utilizada para el análisis y la cuantificación de proteínas, péptidos, toxinas, ácidos nucleicos y otros compuestos (Abonnenc et al., 2010; Aebersold and Mann, 2003; Fenselau and Anhalt, 1975; Giebel et al., 2010; Sauer and Kliem, 2010).

El espectrómetro de masas produce, separa y detecta iones en fase gaseosa. Los elementos principales que forman un espectrómetro de masas son tres: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector. Los tres

elementos se mantienen en una atmósfera de vacío (Duncan et al., 2008; Jurinke et al., 2004).

MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*), viene a ser un método para analizar la composición de proteínas de una célula bacteriana con alta sensibilidad, y ha emergido como una nueva tecnología para la identificación de especies microbianas (Alispahic et al., 2010; Mellmann et al., 2008). En general, nuevas tecnologías para una identificación rápida y exacta de bacterias son esenciales para la vigilancia epidemiológica, por ejemplo, el reconocimiento de brotes nuevos, el análisis de transmisión cruzada y el monitoreo de programas de tratamiento, incluyendo la aplicación de antagonistas de bacterias (Sauer et al., 2008). MALDI-TOF MS es un método confiable para la clasificación e identificación de microorganismos con aplicaciones en diagnósticos clínicos, investigación ambiental y taxonómica y control de la calidad del procesamiento de alimentos (Maier et al., 2006).

El espectro de masa obtenido es adquirido usando un espectrómetro de masas en modo de línea positiva en máxima frecuencia (20-200 Hz dependiendo del instrumento). El rango del espectro de masa medido es de 2,000 a 20,000 Da en proteínas (Maier et al., 2006). Esta técnica produce un perfil de espectros consistiendo en una serie de picos, un “*fingerprint*” característico derivado de proteínas ribosomales, entonces, se genera un perfil único en unidades de masa en Daltones (Da) y carga (z) para diferentes microorganismos basados sobre diferencias inherentes en las proteínas celulares expresadas por las especies microbianas (Barbuddhe et al., 2008).

La posible utilización de MALDI-TOF MS en laboratorios de rutina se ha evaluado comparando este método con la identificación fenotípica, dando resultados prometedores ya que puede remplazar la tinción de *Gram* y la identificación bioquímica en un futuro cercano (Seng et al., 2009).

Se han establecido bases de datos de referencia de especies seleccionadas como son *Arcobacter*, *Helicobacter* y *Campylobacter* para identificación en MALDI-TOF MS. Además, las especies con significancia como patógenos asociados a

alimentos *Arcobacter butzleri*, *Helicobacter pullorum*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* y muchos otros miembros de estos géneros, fueron incluidos en una librería de referencia para determinar la especificidad de las especies de la base de datos. Resultados indican que MALDI-TOF MS es un método fácil y confiable para la identificación de especies de *Arcobacter* y *Helicobacter*, y su distinción de especies de *Campylobacter* fenotípicamente similares con aplicaciones en diagnósticos clínicos (Alispahic et al., 2010). También se han realizado estudios de identificación de cepas *Staphylococcus* que sugieren que el método de MALDI-TOF MS, podría ser útil en la caracterización de este género de forma rápida y confiable (Dubois et al., 2010).

2.2.2 Análisis de rDNA 16S

En la década de 1970, Carl R. Woese y sus colaboradores propusieron un sistema de clasificación filogenética basado en el análisis de secuencias de RNA ribosomal de la subunidad pequeña (*Small subunit ribosomal RNA* o SSU rRNA), rRNA 16S para especies procariontas (Bacteria y Archaea), y rRNA 18S para especies eucariotas (Pechman and Woese, 1972; Woese, 1987). Los análisis comparativos usando estas secuencias pueden revelar relaciones evolutivas entre los organismos (DeLong, 2004; Lane et al., 1985; Weisburg et al., 1991).

Los RNA ribosomales se consideran moléculas antiguas, teniendo un papel esencial estable en la síntesis de proteínas, están conservados entre organismos que no tienen una relación cercana filogenéticamente, por lo que están distribuidos universalmente. Se sabe también que no son afectados por cambios ambientales (Rosselló-Mora and Amann, 2001). En particular el gen de rRNA 16S tiene muchas características que han favorecido su uso en análisis moleculares de filogenia y diversidad, incluyendo longitud adecuada de ~1.5 kb, de tal modo que proporcionan una visión de la evolución abarcando a todos los seres vivos, tienen regiones altamente conservadas entre especies distantes y su fácil manipulación (Rosselló-Mora and Amann, 2001). En general no es afectado grandemente por procesos de transferencia horizontal de genes (Rosselló-Mora and Amann, 2001; Santos-Pontes et al., 2007), además de que existen en la actualidad bases de datos extensas

debido a su amplio uso en estudios de taxonomía, tal como *Ribosomal Data Project II* (Cole et al., 2014) y programas como *BLAST 16S Prokaryotic Ribosomal RNA* de NCBI.

Los ribosomas son las maquinarias de síntesis de proteínas a través de la traducción de mRNA. En procariontes existen subunidades ribosómicas 30S y 50S, que al unirse dan lugar a ribosomas 70S. La subunidad 30S consta de rRNA 16S, mientras que la subunidad 50S consta de rRNA 5S y 23S, todos codificados por genes (Alberts et al., 2014). Estos genes se encuentran organizados comúnmente en operones que contienen secuencias llamadas espaciadores transcritos internos (*Internal Transcribed Spacers, ITS*) (**Figura 2**), los cuales varían enormemente en secuencia nucleotídica y tamaño (Acinas et al., 2004; Fogel et al., 1999). Estas regiones espaciadoras, especialmente las localizadas entre los genes de rRNA 16S y 23S, tienen más variación genética (hipervariables) que las otras regiones que codifican rRNAs, debido a la variación en número y tamaño de genes de tRNA en esas secuencias, además de que estas regiones espaciadoras presentes en las copias de operones pueden presentar variación intragenómica (Stewart and Cavanaugh, 2007). Se ha observado que las especies de bacterias pueden tener hasta 15 copias del operón ribosomal en su genoma (Acinas et al., 2004; Fogel et al., 1999; Rainey et al., 1996), cuyo número refleja estrategias ecológicas importantes en bacterias (Klappenbach et al., 2000).



Figura 2| Representación esquemática de un operón de rRNA. El número de genes de tRNA está sujeto a variación. Tomado y modificado de (Jensen et al., 1993).

Woese introdujo un enfoque de la filogenia universal de la vida dividido en tres Dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya (Woese et al., 1990). Dentro del Dominio Bacteria el encontró 11 divisiones basadas en el análisis de rRNA 16S, proporcionando así una filogenia unificada para las bacterias (Woese, 1987). Hasta 2009 se habían reportado al menos 80 divisiones o phyla, muchos de los cuales han sido definidos exclusivamente por secuencias de DNA ambiental.

Los estudios filogenéticos y de análisis de comunidades microbianas, se basan en comparaciones de secuencias de nucleótidos para las cuales se han desarrollado métodos específicos como la obtención de secuencias de DNA a través de PCR, donde se implementan oligonucleótidos que funcionan como cebadores en la fase de elongación, en numerosos trabajos frecuentemente han sido usados los *primers* universales para bacterias 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') para rDNA 16S (Nercessian et al., 2005; Vergin et al., 1998; Weisburg et al., 1991; Wilson et al., 1990), los cuales amplifican casi toda la longitud del gen (Frank et al., 2008). La secuenciación del producto de PCR provee una secuencia de ~1.5 kb, suficientes para hacer inferencias de la evolución molecular. Una vez obtenida esta secuencia, el siguiente paso consiste en alinear tal secuencia con secuencias de genes homólogos de otras cepas o especies con el objetivo de identificar diferencias entre secuencias que puedan mostrar datos de desapareamientos, inserciones o deleciones (Eguiarte et al., 2007; Nei and Kumar, 2000). Para reconstruir la historia evolutiva basada en diferencias de las secuencias de nucleótidos, implica la construcción de un árbol filogenético, que pueda mostrar gráficamente las relaciones entre de las secuencias problema. Esta construcción de árboles emplea métodos bioinformáticos cladísticos como Máxima Verosimilitud, Máxima Parsimonia y algoritmos Bayesianos resultando en un árbol filogenético o cladograma (Eguiarte et al., 2007; Hall, 2013; Nei and Kumar, 2000).

Ya que los genes SSU han cambiado muy lentamente, han evidenciado desventajas y debilidades en el método, en tanto que las funciones primordiales del rRNA aparentemente han limitado el rango de cambio que estos genes han

experimentado durante su evolución. En consecuencia, se ha visto que el rango de variación de los genes del SSU rRNA puede no ser suficiente para proporcionar una buena resolución entre especies bacterianas (Madigan et al., 2009). Este fenómeno se ha observado claramente en el género *Bacillus*, donde especies diferentes fenotípicamente como *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus anthracis* muestran diferencias en solo unas pocas bases en sus secuencias de rRNA 16S (Medini et al., 2008; Sacchi et al., 2002). Otra prueba de que este método de tipificación bacteriana no siempre es eficiente, es el hecho de ser un método pobre para resolver subpoblaciones dentro de especies, por lo que se debe recurrir a otros métodos como el MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) (Medini et al., 2008; Selander et al., 1986). Otra limitante del análisis de rRNA 16S, es que hay organismos con polimorfismos en las regiones usadas para el diseño de *primers* universales, los cuales detectan pobremente estas especies o simplemente no son capaces de detectarlas, el phylum Nanoarchaeota de Archaea es un ejemplo de ello al carecer de detección a través de estudios ecológicos basados en PCR (Huber et al., 2002; Medini et al., 2008).

2.3 Resistencia bacteriana a fármacos antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que fue sensible originalmente (Madigan et al., 2009; WHO, 2015).

En la actualidad, la emergencia de cepas bacterianas patógenas con capacidades de resistencia a múltiples antimicrobianos ha representado una amenaza y un tema de preocupación en clínica a nivel mundial. Esta problemática ha resultado en dificultades en la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas graves (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2013; WHO, 2015). En Estados Unidos cada año, al menos dos millones de personas llegan a ser infectadas por bacterias resistentes a antibióticos, de las cuales, al menos 23,000 mueren cada año debido al difícil tratamiento de esas infecciones (CDC, 2016). Esta resistencia se ha convertido en uno de los principales problemas de salud en el siglo

XXI, lo que autores llaman “La Era Post Antibiótica” (Alanis, 2005; Falagas and Bliziotis, 2007). Las bacterias pueden volverse resistentes a agentes antimicrobianos por cambios genéticos como mutaciones cromosómicas, o por expresión de material genético extracromosómico contenidos en plásmidos o transposones. Bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* además de especies de la familia Enterobacteriaceae como *Klebsiella pneumoniae*, son solo algunos ejemplos de especies donde es bien conocida su resistencia a múltiples agentes antimicrobianos o de pan-resistencia (*pandrug-resistant*, PDR), es decir, resistencia a todos los antibióticos disponibles (Falagas and Bliziotis, 2007; Jones and Pfaller, 1998; Neu, 1992).

Se ha observado que el mal uso de los antimicrobianos, como los antibióticos, acelera la emergencia de cepas resistentes (WHO, 2015), donde intervienen factores o prácticas que inducen la selección de cepas bacterianas con resistencia (**Figura 3**) como el uso indiscriminado en el ganado y en agricultura durante la profilaxis, el tratamiento de infecciones (uso terapéutico) y para crecimiento, en el caso del uso veterinario; además del uso en medicina donde en al menos el 50% de los casos las dosis recomendadas o la duración del tratamiento son incorrectos y a menudo el incumplimiento en el seguimiento terapéutico por parte de los pacientes (Davies and Davies, 2010; Levy, 2002; Madigan et al., 2009; WHO, 2015).

La resistencia a antibióticos era inicialmente un problema hospitalario asociada con el incremento en el número de infecciones adquiridas en hospitales, usualmente enfermedades críticas, esta resistencia está ahora extendida en la comunidad causando severas infecciones que son difíciles de diagnosticar y de tratar (Alanis, 2005).

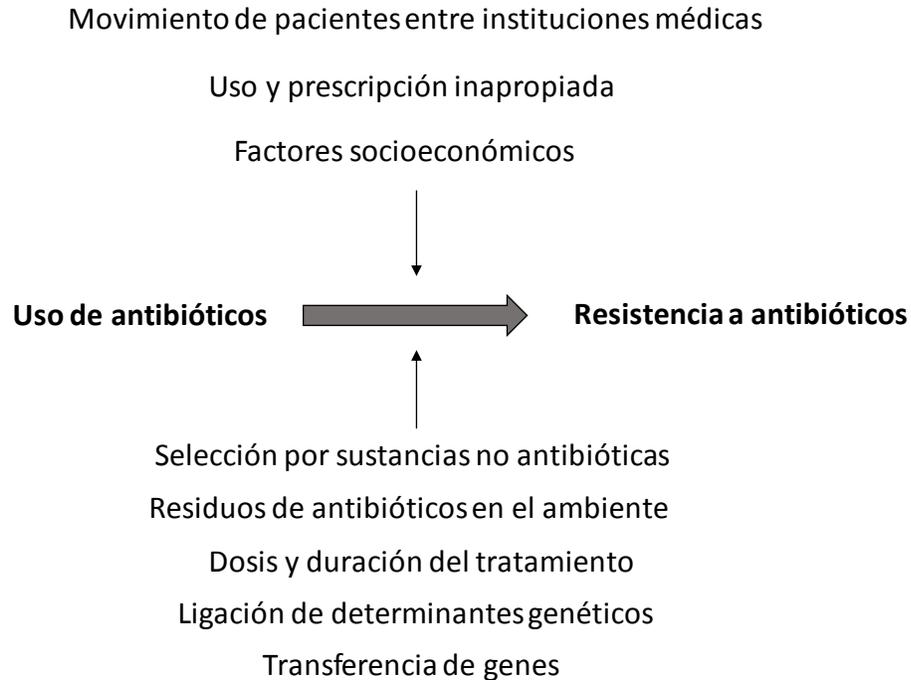


Figura 3| Factores que influyen en el desarrollo de resistencia bacteriana a antibióticos.
Tomado y modificado de (Levy, 2002)

2.3.1 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos principales de resistencia en bacterias pueden ser de dos tipos: resistencia natural o intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia natural es propia de cada grupo bacteriano, ya sea especie o familia, de ahí por ejemplo que todos los patógenos *Gram* negativos sean resistentes a Vancomicina (debido a que no puede penetrar la membrana externa), tal característica es invariable. Lo contrario sucede con la resistencia adquirida, que si es variable incluso entre cepas de la misma especie, cuyo proceso implica cambios en la composición genética de una bacteria (Chen et al., 2009; Kaye et al., 2004). Las estrategias principales que presentan las bacterias para bloquear la acción de los antimicrobianos se muestran en la **Tabla 1**, donde están implicados los mecanismos de la disminución de la concentración del fármaco en el citoplasma, donde se incluyen reducción de la permeabilidad de la membrana externa y la capacidad de transporte por parte de la

membrana citoplásmica, además de la expresión de bombas de eflujo (proteínas de membrana exportadoras de moléculas que pueden ser específicas para un simple antibiótico o para múltiples antibióticos), inactivación enzimática del fármaco ya sea por hidrólisis (ej. acción de la β -lactamasa contra las penicilinas), o por la transferencia de un grupo químico (ej. los antibióticos aminoglicósidos son susceptibles a ser inactivados por cambios en sus moléculas); la inactivación enzimática es considerado el mecanismo de resistencia más común de origen natural (Davies, 1994; Nikaido, 2010; Wright, 2007). Por otra parte, las modificaciones de los blancos moleculares a través de mutaciones juegan un papel importante en la resistencia, tal es el caso de los genes mutados que codifican para la enzima RNA polimerasa, la cual confiere resistencia a Rifampicina, un inhibidor de la síntesis de mRNA, además para fluoroquinolonas, Sulfonamida, Trimetoprima, Tetraciclina, aminoglicosidos, antibióticos MLS, oxazolidinonas como el Linezolid y lipopeptidos como la Daptomicina (Aleksun and Levy, 2007). Otro mecanismo es la eliminación del blanco molecular y por consiguiente la generación de una vía metabólica alterna (Neu, 1992) que es resistente (Aleksun and Levy, 2007; Blair et al., 2015; Chen et al., 2009; Nikaido, 2010).

Las diferencias estructurales entre bacterias *Gram* positivas y *Gram* negativas determina los mecanismos de resistencia primarios, ya que los blancos moleculares de diversos agentes antibacterianos actúan sobre la pared celular, la membrana citoplásmica, e incluso dentro del citoplasma. En las *Gram* negativas, la membrana externa provee una barrera natural (intrínseca) contra los antimicrobianos, además de las modificaciones en su permeabilidad dada por las alteraciones en los canales de las porinas y la actividad de sistemas de eflujo que bombean las moléculas al medio extracelular, contribuyen a la alta resistencia de las *Gram* negativas (Chen et al., 2009).

Se ha observado que la resistencia a múltiples fármacos puede ser generada por uno de dos mecanismos, primero, que la bacteria acumule múltiples genes que codifiquen resistencia para un solo fármaco en una sola célula, en este proceso intervienen frecuentemente los plásmidos R. El segundo mecanismo es el

incremento en la expresión de genes que codifican bombas de eflujo para múltiples antimicrobianos (Nikaido, 2010).

Tabla 1|Mecanismos generales de resistencia a los agentes antibacterianos*

	Mecanismo de resistencia	Ejemplos
Resistencia Natural	Disminución de la concentración intracelular del fármaco: Reducción en la permeabilidad de la membrana externa Disminución del transporte de la membrana citoplásmica Bombas de eflujo (Efflux pumps)	β -Lactámicos (ej, OmpF, OprD) Quinolonas (ej, OmpF) aminoglicosidos Tetraciclinas (ej, tetA) Quinolonas (ej, norA) Macrólidos (ej, mefA) Múltiples fármacos (ej, mexAB-OprF)
Resistencia adquirida	Inactivación enzimática del fármaco	β -Lactámicos (b-lactamasas) Carbapenemasas (carbapenemas) Aminoglicosidos (modificando enzimas) Chloramphenicol (inactivando enzimas) Quinolonas (modificaciones en girasa) Rifampicina (unión a la RNA polimerasa)
	Modificación del blanco: mutaciones	β -Lactámicos Macrólidos (metilación de rRNA) Linezolid (modificaciones en 23S rRNA)
	Anulación del blanco, vía metabólica resistente	Glycopeptidos (vanA, vanB) Trimetoprima (cepas deficientes en timidina)

*Adaptado y modificado de (Chen et al., 2009)

Esta última característica está ligada a la multiresistencia observada en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *S. maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *B. pseudomallei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* entre otras (Aleksun and Levy, 2007).

Adicionalmente a los mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos, se han descrito otros mecanismos de resistencia denominados como no heredables. El primero es el fenómeno de Indiferencia a la Droga (*Drug Indifference*), observado por primera vez en antibióticos β -lactámicos, consistiendo en que cuando las bacterias no se encuentran en procesos de división y/o están en un medio pobre en nutrientes para mantener un metabolismo activo, son parcial o completamente refractarias (resistentes) a ser inhibidas por muchos tipos de antimicrobianos. Si bien todos los antibióticos muestran actividad en poblaciones bacterianas en crecimiento, se han hecho experimentos donde cultivos bacterianos con fase estacionaria de crecimiento han sobrevivido después de tratamientos con Tetraciclina y Ampicilina y respondido de igual manera comparándolos con cultivos libres de antibióticos. Existe otro fenómeno conocido como Persistencia bacteriana (*Bacterial Persistence*) el cual se caracteriza por la incapacidad de los antibióticos para matar a todas las células bacterianas, aun cuando éstas se encuentran en medios con disponibilidad de nutrientes y con un crecimiento activo, a medida que pasa el tiempo, la tasa de muerte bacteriana disminuye y, por lo tanto, sobreviven grandes cantidades de células viables. Por otra parte, en el medio natural las poblaciones de bacterias tienden a formar agregados celulares llamados Biopelículas (*Biofilms*). Tal forma de crecimiento puede contener células que son sensibles embebidas en la matriz polisacáridica, pero son refractarias de varios antibióticos, ya sea porque el antibiótico no se difunde en la matriz, o porque presenta una forma de Indiferencia a la droga ya que no metabolizan activamente por la insuficiencia de nutrientes (Levin and Rozen, 2006).

2.3.2 Difusión de la resistencia

El grado de exposición de poblaciones de cepas patógenas resistentes a los antimicrobianos induce la selección de variantes resistentes (Andersson and Hughes, 2010), se ha demostrado también que dosis subinhibitorias inducen la selección de cepas resistentes. Se sabe que hay liberación de antibióticos al ambiente en sectores hospitalarios seleccionando y dando lugar a la transferencia de resistencia a partir de mecanismos de transferencia horizontal de genes (*horizontal gene transfer*, HGT), esta liberación al ambiente de antibióticos está

asociada a su vez, con la existencia de un gran reservorio de genes de resistencia en la microbiota humana con la capacidad de ser donadores potenciales en la transferencia de determinantes genéticos a cepas patógenas (Sommer et al., 2009). El fenómeno de adquisición de genes de resistencia, implica la transferencia de DNA proveniente de una fuente externa, esa fuente es otra bacteria (Bennett, 2008).

Los mecanismos de resistencia adquirida implican procesos de mutación de genes codificantes de proteínas blanco de los antibióticos, y también procesos de transferencia de determinantes genéticos (secuencias nuevas de DNA) (Bennett, 2008) como plásmidos, transposones, bacteriófagos, integrones y otros elementos genéticos móviles **Tabla 2** (Alekshun and Levy, 2007; Levy and Marshall, 2004). Estos determinantes albergan genes de resistencia que pueden ser transmitidos entre bacterias de diferentes grupos taxonómicos y ecológicos (poblaciones o comunidades microbianas). Los elementos Movilizables y de Conjugación juegan un papel importante en la HGT. Los elementos Movilizables contienen toda la información genética necesaria para transferirse de una célula bacteriana a otra, mientras que los elementos de Conjugación utilizan las funciones de Conjugación de otros elementos Conjugativos (plásmidos o transposones de Conjugación), para su transferencia a otra célula. Los bacteriófagos también son factores importantes en procesos de HGT, el bacteriófago por transducción (empaquetamiento del DNA bacteriano en la cápside del virus), lo inyecta a una célula nueva diseminando genes de resistencia contenidos en el DNA bacteriano (Van-Hoek et al., 2011).

Un plásmido ha sido definido como un elemento extracromosómico circular o linear que contiene su propio origen de replicación, es decir, se replican independientemente del cromosoma bacteriano (Bennett, 2008). Estos elementos han sido encontrados en casi todos los géneros bacterianos. Existen plásmidos que contienen los genes necesarios para llevar a cabo conjugación, llamados plásmidos de Conjugación, sin embargo, existen otros que carecen de estos genes de conjugación pero que albergan un origen de transferencia (*oriT*), llamados plásmidos Movilizantes. En ambos casos pueden contener genes de resistencia a antibióticos con el potencial de difundirse a nuevas células.

Tabla 2| Elementos genéticos móviles

Elemento Genético	Características Generales
Plásmido	Tamaño variable (1->100 kb), conjugativo y movilizable
Secuencia de Inserción	Pequeña (<2.5 kb) contiene repeticiones terminales invertidas y especifica una transposasa
Transposón Compuesto	Flanqueado por secuencias de inserción y/o repeticiones invertidas
Transposón Complejo (Complex)	Grande (>5 kb), flanqueado por repeticiones terminales invertidas cortas y especifica una transposasa y una recombinasa
Transposón Conjugativo	Promueve la auto-transferencia
Bacteriófago Transponible	DNA viral que puede insertarse en el cromosoma
Otros elementos Transponibles	No son ni compuestos, ni complejos, ni conjugativos
Integrón	Facilita la adquisición y diseminación de cassettes genéticos; especifica una integrasa, sitios de adhesión y elementos transcripcionales para manejar la expresión de genes de resistencia

En algunos casos, los plásmidos adquiridos pueden perderse por la incapacidad de replicarse nuevamente en el nuevo hospedero, por otra parte, si el plásmido contiene un gen de resistencia dentro de una región transponible, este gen tendrá el potencial de recombinarse dentro del genoma de la bacteria receptora (Couturier et al., 1988; Van-Hoek et al., 2011). Además de contener genes de resistencia a antibióticos, los plásmidos pueden albergar genes de resistencia a metales pesados tóxicos como mercurio (Hg) y cadmio (Cd) (Bennett, 2008).

Un transposón, por su lado, al igual que los plásmidos de conjugación, poseen un origen de transferencia, pero difieren en que no contienen un origen de replicación. Estos elementos tienen la habilidad de “saltar” en regiones distintas de la misma molécula de DNA o entre moléculas llevando en si genes de resistencia (Bennett, 2008; Van-Hoek et al., 2011).

En la actualidad se reconocen tres principales mecanismos de difusión o adquisición de los determinantes genéticos de resistencia, tales como Conjugación, Transfección y Transformación que se ilustran en la **Figura 4** (Andersson and Hughes, 2010; Chen et al., 2009; Davies, 1994; Holmes et al., 2015; Levy and Marshall, 2004; Nikaido, 2010; Thomas and Nielsen, 2005).

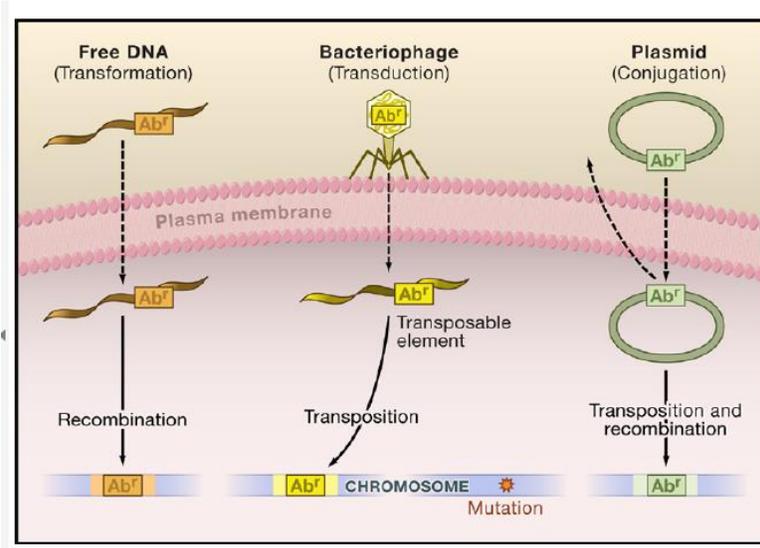


Figura 4| Mecanismos de adquisición de la resistencia. Los principales mecanismos son Transformación (DNA libre), Transducción (A través de bacteriófagos a menudo con elementos transponibles) y Conjugación (Plásmidos R, uniones célula-célula); Ab^r : *Antibiotic resistance*. Tomado de (Alekhshun and Levy, 2007).

2.3.2.1 Transformación

Es un proceso definido por la conversión del genotipo en otro por la introducción de DNA exógeno (fragmentos de DNA de fuentes externas liberados por células descompuestas, células lisadas o partículas virales y liberación por células vivas) a la célula (Thomas and Nielsen, 2005). Fue descubierto en 1928 por Frederick Griffith en experimentos con *Streptococcus pneumoniae*, el proceso fue estudiado más tarde en 1944 por los científicos Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod, y Maclyn McCarty demostrando que el DNA era el “principio transformante” (Griffiths et al., 2000) . Este DNA exógeno es entonces integrado al cromosoma bacteriano, es decir, hay recombinación que después se expresará funcionalmente (Thomas and Nielsen, 2005). Para que el fenómeno de transformación pueda ocurrir, primero las células bacterianas deben desarrollar un estado fisiológico controlado de Competencia.

Tal proceso de transformación ha sido detectado en Archaea y en los phyla de Bacteria incluyendo cianobacterias, Bacterias *Gram* positivas, *Gram* negativas, *Thermus sp.*, *Deinococcus sp.*, bacterias verdes del azufre y muchas bacterias patógenas de humanos como *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* sufren transformación natural (Lorenz and Wackernagel, 1994).

2.3.2.2 Conjugación

La conjugación es un proceso ligado específicamente a los plásmidos. La transferencia conjugativa es mediada por uniones célula-célula y un poro a través del cual el DNA pasa a la célula receptora (Alanis, 2005).

La transferencia conjugativa se ha descrito como una colección de diversos procesos, los sistemas más complejos conocidos son aquellos codificados por grandes plásmidos autotransmisibles de las *Gram* negativas que generan un pili. Esta estructura medía el contacto célula-célula para generar una unión que consta de un poro por el cual se transporta el DNA del plásmido y proteínas codificadas por la célula donadora. Además, algunos elementos genéticos como otros plásmidos o el propio cromosoma del hospedero, que no pueden transferirse, en ocasiones pueden movilizarse durante la conjugación (Thomas and Nielsen, 2005). De hecho, la conjugación se descubrió porque el plásmido F de *E. coli* puede movilizar el cromosoma del hospedador (Madigan et al., 2009).

2.3.2.3 Transducción

En la transducción, un bacteriófago transfiere el DNA de una célula a otra (Alanis, 2005). Estos virus pueden transferir los genes del hospedero por transducción generalizada o por transducción especializada. En la primera, el DNA de cualquier fragmento del genoma del hospedador es empaquetado dentro del virión maduro en lugar del genoma del virus. En la segunda, El DNA de una región específica del cromosoma de la célula se inserta directamente en el genoma del virus reemplazando sus propios genes. Estos bacteriófagos que llevan a cabo transducción, ya sea generalizada o especializada, no son infecciosos, ya que han sustituido todos o algunos de los genes necesarios para la infección. No todos los

fagos pueden transducir, ni todas las bacterias son transducibles, pero este proceso está lo suficientemente extendido para ser un factor importante en la transferencia de genes en la naturaleza (Griffiths et al., 2000; Madigan et al., 2009; Ochman et al., 2000).

2.4.3. El ambiente como reservorio de resistencia

Los únicos entornos que están verdaderamente exentos de la influencia de los antibióticos por la utilización humana, existían antes de la era de los antibióticos. Los estudios retrospectivos muestran que los genes de resistencia están presentes en las bacterias que no producen antibióticos antes de la difusión generalizada de los fármacos. Análisis de resistencia a antibióticos de cepas aisladas y almacenadas años antes del uso extensivo autorizado de, por ejemplo, Ampicilina y Tetraciclina, han mostrado genes de resistencia a los mismos. De este modo, los determinantes de resistencia a antibióticos existen de forma natural y, probablemente, fueron sujetos a la transferencia horizontal de genes ante de la enorme presión de selección que trajo la era de los antibióticos.

Debido al movimiento de los antibióticos y genes de resistencia por el viento, no es muy probable encontrar ambientes prístinos. Sin embargo, a pesar del movimiento de las partículas del suelo por fuerzas físicas, el suelo en sí es un complejo estacionario, y algunos suelos están muy alejados de la influencia humana. Por lo tanto, los estudios de resistencia a los antibióticos en el suelo que muestran bacterias ambientales albergan resistencia a los antibióticos de forma independiente de las actividades humanas (Allen et al., 2010). La aplicación de técnicas independientes del cultivo tales como PCR y metagenómica, ha descubierto la vasta diversidad de genes de resistencia a antibióticos de bacterias del suelo (Davies and Davies, 2010). El análisis del resistoma (una colección de todos los genes de resistencia a antibióticos y sus precursores en bacterias patógenas y no patógenas), ayuda a comprender la estructura genética de resistencia además de la evolución y movimiento de tales genes (Wright, 2007).

Las bacterias cultivables del suelo poseen genes que codifican enzimas que degradan o inactivan antibióticos. Incluso existen otras que crecen en medios con antibiótico con única fuente de carbono y nitrógeno, como *Pseudomonas fluorescens* que crece con Estreptomicina, una cepa de *Flavobacterium sp.* crece sobre Cloramfenicol (Allen et al., 2010).

Se estima que los antibióticos han sido producidos desde hace aproximadamente 500 millones de años, datando del periodo Cámbrico, también se cree que las moléculas de los antibióticos, o parte de ellas, es probable que sean más antiguas que incluso los aminoácidos no proteicos que constituyen antibióticos peptídicos encontrados en meteoritos y otras fuentes antiguas (Johnson et al., 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

La habilidad de los microorganismos para crecer y reproducirse en ambientes de espacios cerrados se ha conocido por muchos años. Entre estos microorganismos se encuentran bacterias patógenas de humanos que pueden mostrar altos niveles de resistencia a los fármacos antimicrobianos, es importante entonces conocer esa diversidad microbiana mediante el desarrollo de monitoreos ambientales utilizando métodos de detección y cuantificación microbiana rápidos y exactos. Existen diversos estudios de monitoreo ambiental en hospitales debido a su importancia en infecciones nosocomiales, sin embargo, el monitoreo ambiental para conocer microorganismos asociados a los lugares de trabajo en la industria farmacéutica y de cosméticos son escasos. Además, la identificación de microorganismos en estos ambientes se sigue haciendo a través de métodos microbiológicos de rutina, como son el cultivo y aislamiento, seguido de la identificación fenotípica del microorganismo o por kits comerciales de identificación bioquímica, (FDA, 2001). El tiempo necesario para la obtención de la especie, en el mejor de los casos, puede variar de 24 h para el aislamiento y un tiempo adicional de 24 a 48 h para la identificación de especies (Cherkaoui *et al.* 2010), por lo que es de suma importancia reducir el tiempo del análisis microbiológico y el costo. Es necesario invertir entonces en nuevas metodologías de diagnóstico capaces de detectar e identificar cualquier microorganismo de manera rápida y fiable. A lo largo de los últimos años, se han desarrollado diferentes técnicas moleculares basadas en la amplificación genética con el objetivo de reducir el tiempo necesario para la identificación de los microorganismos implicados en diferentes tipos de procesos infecciosos.

MALDI-TOF MS, es una plataforma automatizada de identificación bacteriana caracterizada por su rapidez, Mellmann *et al.* (2008) mencionan que una vez obtenido un cultivo puro del microorganismo a identificar, esta plataforma proporciona resultados exactos y reproducibles en 10 minutos, por lo que el tiempo adicional hasta de dos días para la identificación se reduciría significativamente.

El fortalecimiento del diagnóstico microbiano con nuevas plataformas ampliará la capacidad técnica de la manufactura donde se realizó este estudio, y favorecerá el desarrollo de estrategias de contingencia para disminuir los riesgos de daños a los productos cosméticos. Por otra parte, es importante conocer el perfil de resistencia y sensibilidad bacteriana presentes en el aire del laboratorio de bioseguridad nivel 2, donde se lleva a cabo el análisis microbiano de muestras de productos terminados y del ambiente, lo anterior, por la alta probabilidad de adquisición de infecciones difíciles de tratar por parte de sus ocupantes, en especial por individuos inmunocomprometidos. Se ha observado, por ejemplo, que en espacios cerrados abundan bacterias como *Staphylococcus aureus*, la cual ha sido aislada de diversos ambientes, y que además, se ha relacionado con resistencia a múltiples fármacos antimicrobianos y caracterizado por ser un patógeno oportunista.

Un control y manejo del laboratorio de bioseguridad nivel 2 es necesario para minimizar la posibilidad de contaminación microbiana de los productos cosméticos (Adelberg et al., 1989). El hecho de ser un laboratorio nivel 2 implica el análisis de cepas no patógenas y patógenas oportunistas aisladas del ambiente, por lo que es importante conocer los riesgos biológicos al trabajar con dichas cepas, y la contaminación biológica del aire circundante para la prevención de posibles infecciones de sus ocupantes.

4. HIPÓTESIS

El monitoreo microbiológico en muestras de aire en un laboratorio de bioseguridad nivel 2, permitirá identificar una diversidad de géneros bacterianos y asociaciones con multiresistencia a diversos antibióticos.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificación de bacterias a través de MALDI TOF-MS en muestras de aire en un laboratorio de bioseguridad nivel 2 en la industria cosmética

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Aislar e identificar por técnicas proteómicas aislados bacterianos en muestras de aire en un laboratorio de bioseguridad nivel 2.

2.- Evaluar la resistencia de los aislados bacterianos a diversos antibióticos.

6. MÉTODOS

6.1 Muestreo ambiental

Se colectaron muestras de aire de un laboratorio con nivel de bioseguridad 2 de una manufactura multinacional de productos cosméticos en el Estado de Querétaro, México. Seis áreas fueron muestreadas designadas como EC8 (área de almacenamiento general de material), EC28 (área de almacenamiento de medios de cultivo), A32 (cuarto de preparación de medios de cultivo), A33 (área de almacenaje de productos de cuidado personal), A34 (cuarto de incubación) y A35 (área de trabajo común). El muestreo activo del aire fue realizado con el muestreador SAS Super 100 & 180 microbial air sampler (Bioscience International®), donde el flujo de aire es hecho pasar sobre una placa Petri con Agar Soya Trypticaseina (Becton Dickinson™ Tryptic Soy Agar).

6.2 Aislamiento y caracterización fenotípica

Una vez terminado cada muestreo, se incubaron las placas a 35°C por 48h para asegurar el máximo crecimiento de bacterias. El aislamiento se realizó con base en fenotipos diferentes, las cuales fueron nombradas como PG(#) seguido por el número de aislado para identificación. Se recuperaron las cepas en Caldo Soya con glicerol 30% para preservación a -80°C. Después se caracterizaron.

6.3 Identificación bacteriana por MALDI-TOF MS

Los aislados bacterianos fueron identificados por *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), y cuando una cepa no pudo ser identificada por este método correctamente, esta fue identificada por análisis de las secuencias de rDNA 16S. MALDI-TOF MS fue realizado con la plataforma *MicroFlex LT mass spectrometer* (Bruker Daltonics, Germany) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los espectros de masas

fueron analizados usando la librería y software Bruker Biotyper 2.0 (version 2.0, 3,740 entries; Bruker Daltonics). Los scores para el criterio de identificación usados fueron los recomendados por el fabricante: un score de ≥ 1.750 indica identificación a nivel de especie con alto grado de confianza, un score de entre 1.700 y 1.750 indica buena identificación a nivel de género, y un score de < 1.700 fue interpretado como no identificado.

6.4 Identificación molecular por secuenciación de rDNA 16S (SSU)

6.4.1 Extracción de DNA, PCR y secuenciación

Para la caracterización molecular de las secuencias de rDNA 16S, las cepas bacterianas fueron crecidas en Caldo Soya Tripticaseina (medio líquido) a 35°C *overnight* y procesado para extracción de DNA usando el método de (Sambrook and Russell, 2001). La amplificación de la secuencia del gen rDNA 16S fue realizada por PCR de punto final con los *primers* conservados para eubacterias, forward (fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y reverse (rD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). Las reacciones fueron hechas en 30 μ l con PCR Master Mix (2X) (Fermentas, Lithuania). El PCR se efectuó usando un Termociclador (C1000 *Thermal Cycler*, Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, USA) cuyos parámetros de reacción fueron los siguientes: 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 45°C por 40 s, y 72°C por 2 min, con un tiempo de elongación final de 5 min a 72°C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando 5 μ l de colorante GelRed y 3 μ l de mezcla de reacción, marcador de peso molecular 1kb (Thermo Scientific™) a 75 V por 60 min., para comprobar si hubo amplificación al termino de las reacciones de PCR. Los productos de amplificación fueron purificados usando el kit *DNA clean concentrator-5* (Zymo Research, CA, USA), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación fueron hechas por Macrogen Korea Institute (Seoul, República de Korea), con la plataforma de secuenciación Sanger por capilares.

6.4.2 Análisis de las secuencias

Las secuencias de rDNA 16S obtenidas fueron comparadas a través de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra secuencias reportadas en GenBank (Benson et al., 2007) y la base de datos *Ribosomal Database Project* (RDP) (Wang et al., 2007). La reconstrucción filogenética fue hecha usando 55 secuencias reportadas del gen rRNA 16S en la base de datos NCBI. Las secuencias fueron alineadas en el programa BioEdit (Hall, 1999) usando el método de CLUSTAL_X2 (Larkin et al., 2007). El análisis filogenético y de evolución molecular fue hecho usando el algoritmo de máxima verosimilitud (Nei and Kumar, 2000) con *Kimura two-parameter distances, bootstrap* de 2500 réplicas, implementado en MEGA versión 6 (Tamura et al., 2013).

6.5 Análisis de resistencia a antibióticos

La susceptibilidad a antibióticos de cada cepa fue determinada por crecimiento de cada cepa en medio líquido (Caldo Soya Trypticaseina). Los cultivos fueron incubados en agitación 150 rpm a 37°C hasta que la suspensión alcanzó una densidad óptica (OD) entre de 0.4 y 0.5 a 600 nm. Un volumen total de 100 µl de cada cepa fue extendida sobre placas de Agar Soya Trypticaseina. Nueve discos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro impregnados con 5 µl de cada solución de antibióticos (Tabla 1), fueron adicionados sobre la superficie de cada placa de agar, se incubaron 24 horas a 37°C. Después de la incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición en mm. Se usó medio líquido sin inocular como control negativo.

En la **Tabla 3** se muestran los antibióticos y sus concentraciones utilizadas para las pruebas de resistencia, también los blancos de acción antimicrobiana para cada uno, así como el solvente usado en cada solución (dH₂O estéril y etanol), almacenados a -20°C.

Tabla 3| Antibióticos usados en las pruebas de resistencia. Se muestra el mecanismo de acción de cada antibiótico, su abreviación y las concentraciones utilizadas.

Mecanismo de Acción	Antibiótico	Concentración µg/ml		
		<CIM	CIM*	>CIM
Inhibición de la síntesis de proteínas	Kanamicina ³ (Km)	5	20	50
	Espectinomicina ³ (Sp)	25	50	75
	Cloramfenicol ² (Cm)	5	25	50
	Tetraciclina ¹ (Tc)	20	40	80
	Estreptomina ³ (St)	150	300	450
Inhibición de la síntesis de pared celular	Carbenicilina ³ (Cb)	50	100	150
	Ampicilina ³ (Am)	2	10	20
Inhibición de la síntesis de rRNA y mRNA	Rifampicina ² (Rf)	20	40	80
Alteración de la membrana citoplasmática	Polimixina-B ³ (P-B)	0.5	2	5

*CIM, Concentración Mínima Inhibitoria que se describe en: *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (1999). ¹Solución en etanol 50%; ²Solución en etanol 95%; ³Solución en dH₂O estéril.

La sensibilidad y resistencia de cada cepa fue determinada por los criterios del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (1999).

6.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas de resistencia a antibióticos fueron hechas por triplicado y la actividad antibacteriana fue expresada como la media de los diámetros de inhibición producidos. Los resultados fueron normalizados (n/media más alta de inhibición), y un análisis de *Cluster* fue hecho representado en un *Heat map* usando el programa estadístico R versión 3.0.2. Donde el valor de 0 (color verde) indica resistencia y el valor de 1 (color rojo) indica sensibilidad.

La prevalencia de las cepas en los seis sitios de muestreo, y las diferencias de diversidad microbiana por cada sitio, fueron representadas en un histograma de frecuencias y un *pie chart* respectivamente, todos construidos en el programa estadístico JMP® versión 7.0.1 (*SAS Institute Inc.*). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para observar diferencias significativas entre de las respuestas totales de las cepas a los antibióticos, además de evaluar qué antibiótico mostró mayor eficacia antibacteriana, construido en el programa estadístico R versión 3.0.2.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación

Para determinar la diversidad bacteriana en el laboratorio de bioseguridad nivel 2 y para determinar si existe multiresistencia a antibióticos, se colectaron muestras de aire de seis sitios. Los resultados de identificación obtenidos por MALDI-TOF MS y secuenciación de rDNA 16S se muestran en la **Tabla 4**. Se identificaron 19 géneros bacterianos de todos los sitios muestreados. Los géneros aislados Gram positivos fueron *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chryseomicrobium*, *Citricoccus*, *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Kocuria*, *Kytococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Planococcus*, *Planomicrobium*, *Sanguibacter*, and *Staphylococcus*. Mientras que los géneros Gram negativos fueron *Pointibacter*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter* y *Skermanella*. En total, 85% de los géneros bacterianos fueron identificados por MALDI-TOF MS, y solo el 15% restante por secuenciación de rDNA 16S. El análisis taxonómico indicó que el género *Bacillus*, representado por cinco especies, fueron las más comunes, seguidas de *Staphylococcus* con cuatro especies, y *Arthrobacter* y *Kocuria* con tres especies.

7.2 Perfil microbiano en los sitios de muestreo

La presencia y la prevalencia relativa de las especies de bacterias es presentada en la **Figura 5**, donde se observan las diferencias en la composición del perfil microbiano en cada sitio de muestreo. Esta comparación mostró que el género más prevalente detectado en todas las áreas muestreadas fue *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*. Algunas otras como *Microbacterium oleivorans*, *Kocuria rosea*, *Citricoccus sp.* y *Arthrobacter phenanthrenivorans* se observó que predominan en cinco sitios muestreados. *Staphylococcus cohnii* fue detectado en cuatro sitios. Las especies prevalentes identificadas en al menos tres sitios fueron *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium xerosis* y *Bacillus korensis*. Las especies prevalentes identificadas en al menos dos sitios fueron *Bacillus subtilis*, *Bacillus litoralis*, *Arthrobacter agilis* y *Agrococcus lahaulensis*.

Tabla 4| Identificación de las cepas totales aisladas

Método				Método					
Aislado	MALDI-TOF MS*	Score	rDNA 16S§	Score	Aislado	MALDI-TOF MS	Score	rDNA 16S	Score
PG1	<i>Kocuria rosea</i>	2.228			PG22			<i>Citricoccus sp.</i>	< 96%
PG2A			<i>Bacillus litoralis</i>	100%	PG23	No Identificada			
PG2B	<i>Bacillus koreensis</i>	1.800			PG24A	<i>Corynebacterium xerosis</i>	2.168		
PG3	<i>Microbacterium oleivorans</i>	1.808			PG24B	<i>Corynebacterium xerosis</i>	2.381		
PG4	<i>Micrococcus luteus</i>	2.347			PG25	<i>Kytococcus sedentarius</i>	2.402		
PG5	<i>Micrococcus luteus</i>	2.315			PG26	<i>Psychrobacter faecalis</i>	1.920		
PG6			<i>Skermanella aerolata</i>	100%	PG27			<i>Kocuria sp.</i>	< 96%
PG7	<i>Chryseomicrobium imtechense</i>	2.000			PG28			<i>Sanguibacter marinus</i>	100%
PG8	<i>Planococcus plakortidis</i>	1.977			PG29	<i>Kocuria aegyptia</i>	1.832		
PG9	<i>Bacillus subtilis</i>	2.417			PG30	<i>Micrococcus luteus</i>	2.165		
PG10			<i>Pontibacter sp.</i>	< 96%	PG31	<i>Staphylococcus cohnii</i>	2.088		
PG11			<i>Pseudomonas sp.</i>	< 96%	PG32	<i>Staphylococcus cohnii</i>	2.372		
PG12	<i>Pseudomonas perfectomarina</i>	2.364			PG33A	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.321		
PG13			<i>Staphylococcus sp.</i>	< 96%	PG33B	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.546		
PG14	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1.890			PG34	<i>Kocuria rosea</i>	1.986		
PG15	<i>Kocuria rosea</i>	2.559			PG35	<i>Agrococcus lahaulensis</i>	2.064		
PG16	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	2.204			PG36			<i>Arthrobacter agilis</i>	< 96%
PG17	<i>Corynebacterium xerosis</i>	2.288			PG37A	<i>Planomicrobium chinense</i>	2.477		
PG18	<i>Staphylococcus xylosus</i>	2.244			PG37B	<i>Planomicrobium chinense</i>	2.317		
PG19	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	2.323			PG38	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	1.868		
PG20	<i>Bacillus altitudinis</i>	2.050			PG39A			<i>Pseudomonas sp.</i>	< 96%
PG21	<i>Bacillus pumilus / safensis</i>	2.136			PG39B			<i>Pseudomonas sp.</i>	< 96%

*Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, §PCR y secuenciación del gen de rRNA 16S

Un alto porcentaje (51.6%) del número total de especies fueron encontradas en al menos un sitio de muestreo con una frecuencia de 1.4%.

La prevalencia relativa de diversidad bacteriana para cada sitio muestreado esta presentado gráficamente en la **Figura 6** (histograma de frecuencias). Aunque los resultados muestran diferencias en diversidad bacteriana, la presencia de múltiples especies para un género dado es el verdadero determinante para la diversidad bacteriana. Por ejemplo, el sitio A32 mostró la más alta diversidad con 9 géneros y 17 especies. Seguido por el sitio A34 con 9 géneros y 13 especies. El sitio EC28 presentó 10 géneros y 12 especies mientras que el sitio A33 presentó 9 géneros y 11 especies y por último el sitio A35 presentó 8 géneros y 10 especies. Aunque los resultados muestren que el sitio EC8 con la menor diversidad bacteriana, este presentó 9 géneros similar a A32, pero tuvo solamente 9 especies.

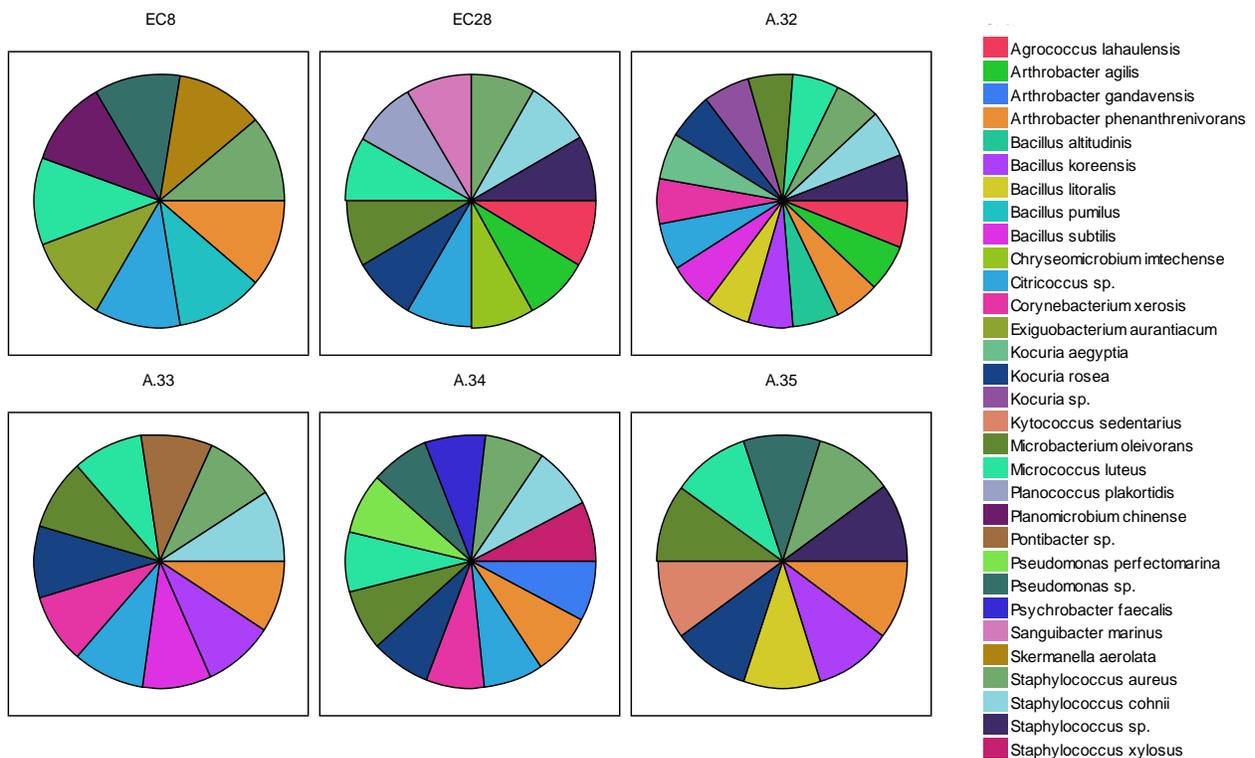
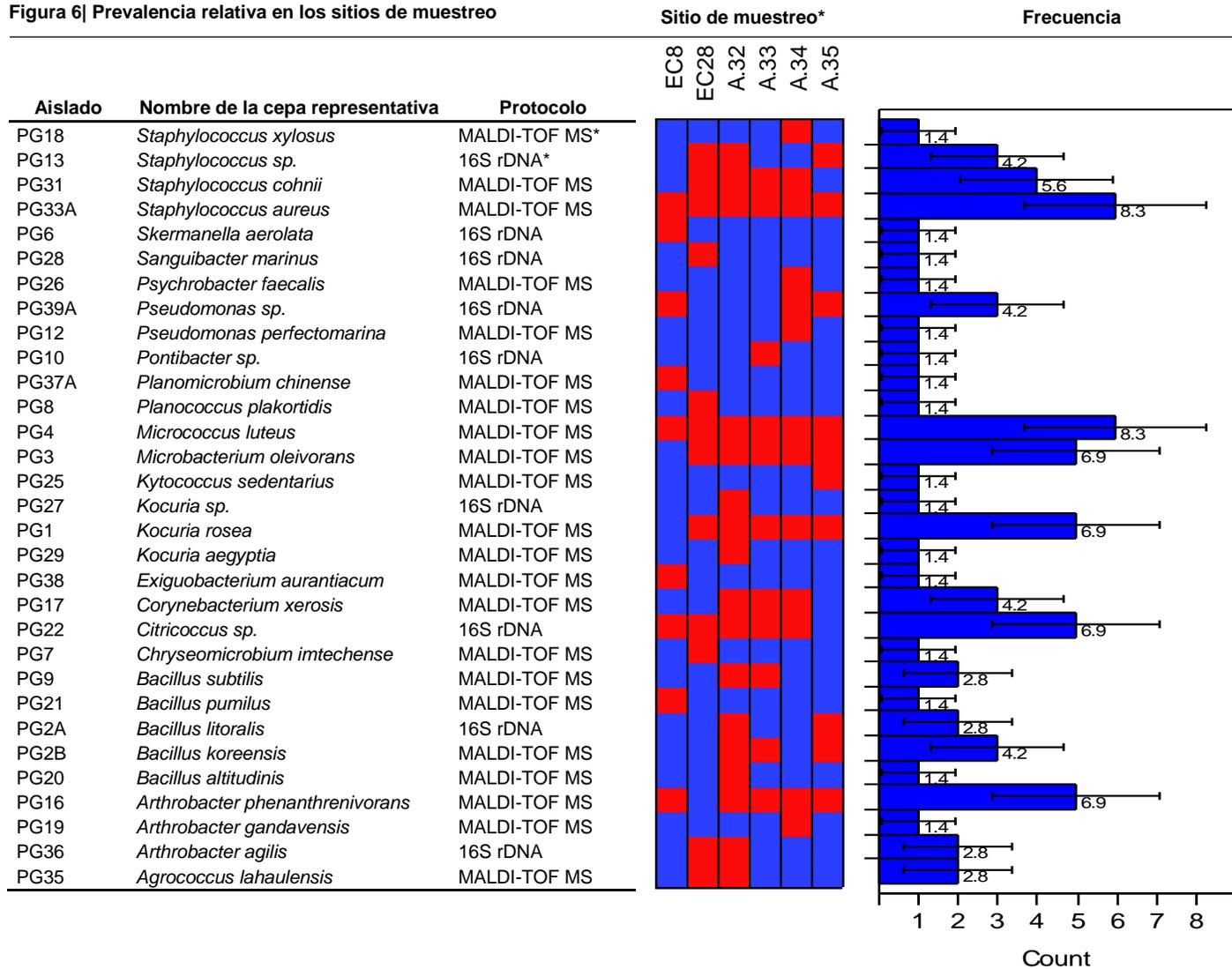


Figura 5| Composición del perfil microbiano en los sitios de muestreo. EC8 (área de almacenamiento general de material), EC28 (área de almacenamiento de medios de cultivo), A32 (cuarto de preparación de medios de cultivo), A33 (área de almacenaje de productos de cuidado personal), A34 (cuarto de incubación) y A35 (área de trabajo común).

Figura 6| Prevalencia relativa en los sitios de muestreo



7.3 Análisis de resistencia a antibióticos

Considerando los resultados de identificación importantes, y el hecho de que los microorganismos juegan un rol importante como patógenos oportunistas, se decidió investigar el impacto potencial de las bacterias aisladas como organismos resistentes a múltiples antibióticos. Cepas representativas de cada género fueron analizadas. Se seleccionaron nueve antibióticos con diferentes blancos intracelulares, como es explicado en materiales y métodos. Se obtuvieron un total de 837 perfiles de respuesta a los antibióticos y un Análisis de *Cluster* fue hecho usando los resultados presentándolos en un *Heat map* (**Figura 7**), se muestran asociaciones interesantes entre resistencia a los antibióticos, géneros y especies. Se observaron cinco *clusters* o grupos principales de géneros bacterianos de quien los componentes de especies mostraron respuestas similares.

Las especies del Grupo I mostraron alta resistencia a Polimixina, Espectinomicina, Kanamicina, cloranfenicol y estreptomina (color verde). Por otra parte, las especies del Grupo I fueron sensibles a Rifampicina, Tetraciclina, Ampicilina y Carbenicilina (color negro-rojo). Las especies del Grupo II y III mostraron una alta resistencia a los antibióticos que se probaron. Esto fue, sin embargo, algo sorprendente el hecho de observar que bacterias *Gram* negativas, tal como *Pseudomonas sp.* y *P. perfectomarina* mostraron resistencia al 100% de los antibióticos probados. De las especies *Gram* positivas, *Staphylococcus cohnii* y *S. xylosus* mostraron alta resistencia a antibióticos. Las especies del Grupo II mostraron alta sensibilidad a rifampicina, entre ellas *Staphylococcus aureus*.

En los Grupos IV y V *Kocuria rosea*, *Corynebacterium xerosis*, *Sanguibacter marinus*, *Arthrobacter agilis* y *Psychrobacter faecalis* mostraron sensibilidad significativa a Rifampicina. *Kocuria rosea* fue una de las especies que mostró sensibilidad a todas las concentraciones de Estreptomina, mientras que *Psychrobacter faecalis* mostró ligeramente menos sensibilidad a Estreptomina. En general la respuesta resistente de estas cepas microbianas probadas fue significativamente más frecuente (~600 respuestas de 837) que los efectos de sensibilidad.

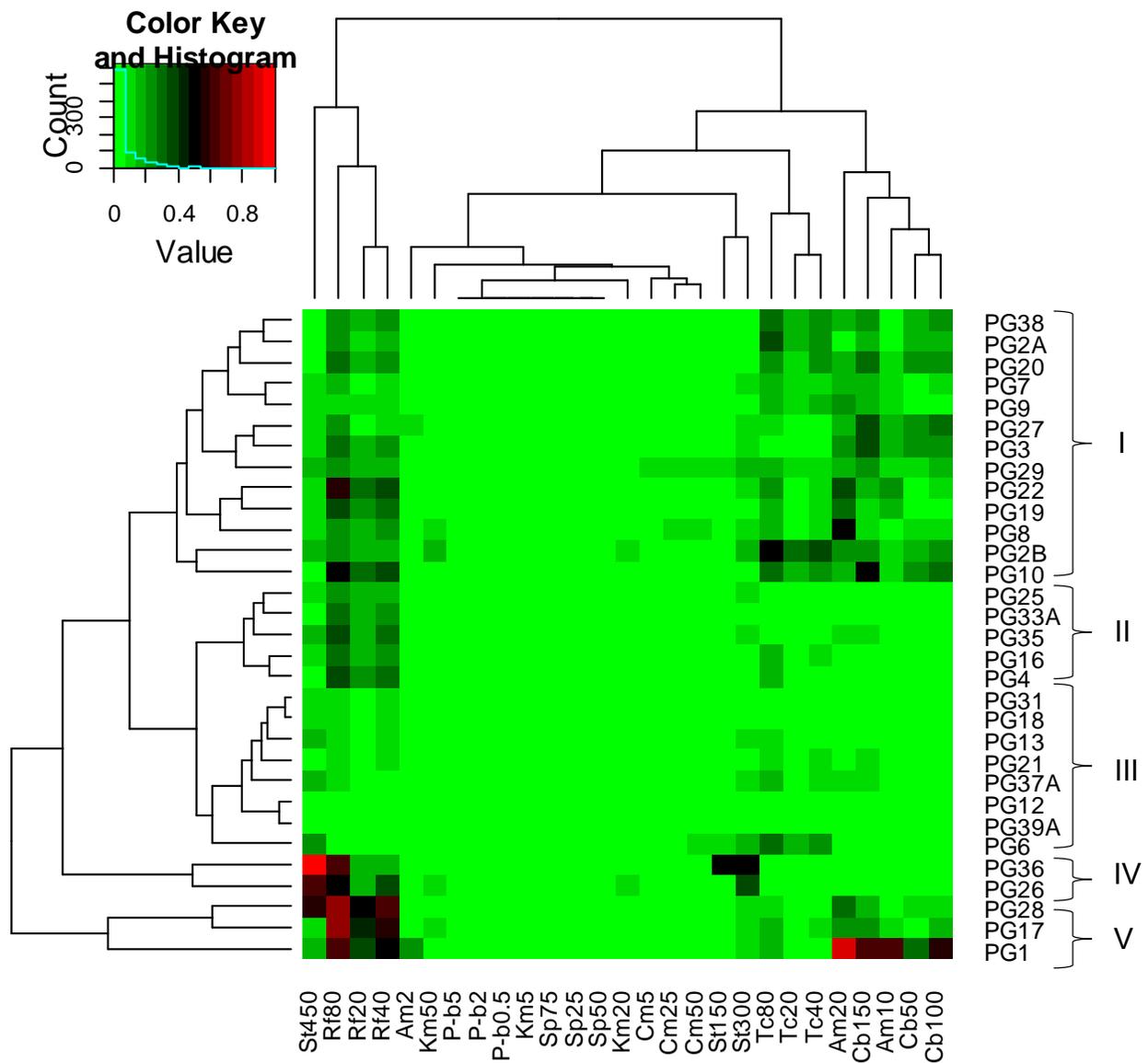


Figura 7| Heat map del perfil de respuesta a antibióticos de las cepas probadas. El agrupamiento jerárquico fue basado sobre 837 respuestas a antibióticos que fueron normalizadas en valores de 0-1. El color verde representa resistencia (Valor de 0) y el color rojo representa sensibilidad (valor de 1). Las cepas bacterianas probadas (mostradas en la Figura 2) están representadas en el eje vertical derecho y las concentraciones de los antibióticos en el eje horizontal inferior del diagrama. En la esquina superior izquierda se muestra la clave de colores además de un histograma de frecuencias de cada valor de respuesta.

Los nueve antibióticos usados corresponden a distintas familias químicas y, por lo tanto, presentan diferentes espectros de acción antimicrobiana, por lo que se evaluaron los distintos niveles de sensibilidad de las tres concentraciones de cada uno. En la **Figura 8** se muestra el efecto de inhibición de los antibióticos sobre las bacterias. El análisis de varianza ANOVA mostró que ningún antibiótico mostró efectos iguales en las cepas probadas ($p=0.001$). El antibiótico que en general presentó una acción antimicrobiana significativa fue Rifampicina (Rf) ($p<0.05$), dentro de este factor en sus tres concentraciones (20, 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$) no se encontraron diferencias significativas de inhibición. Por otra parte, como se muestra en la **Figura 7**, los antibióticos sin efecto inhibitorio alguno ($p>0.05$) fueron Kanamicina (Km) 5 $\mu\text{g/ml}$, Polimixina (P-b) 0.5, 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ y Espectinomicina (Sp) en las tres concentraciones. Como era de esperarse, las concentraciones más altas de los antibióticos, excepto Polimixina y Espectinomicina, produjeron halos de inhibición más grandes.

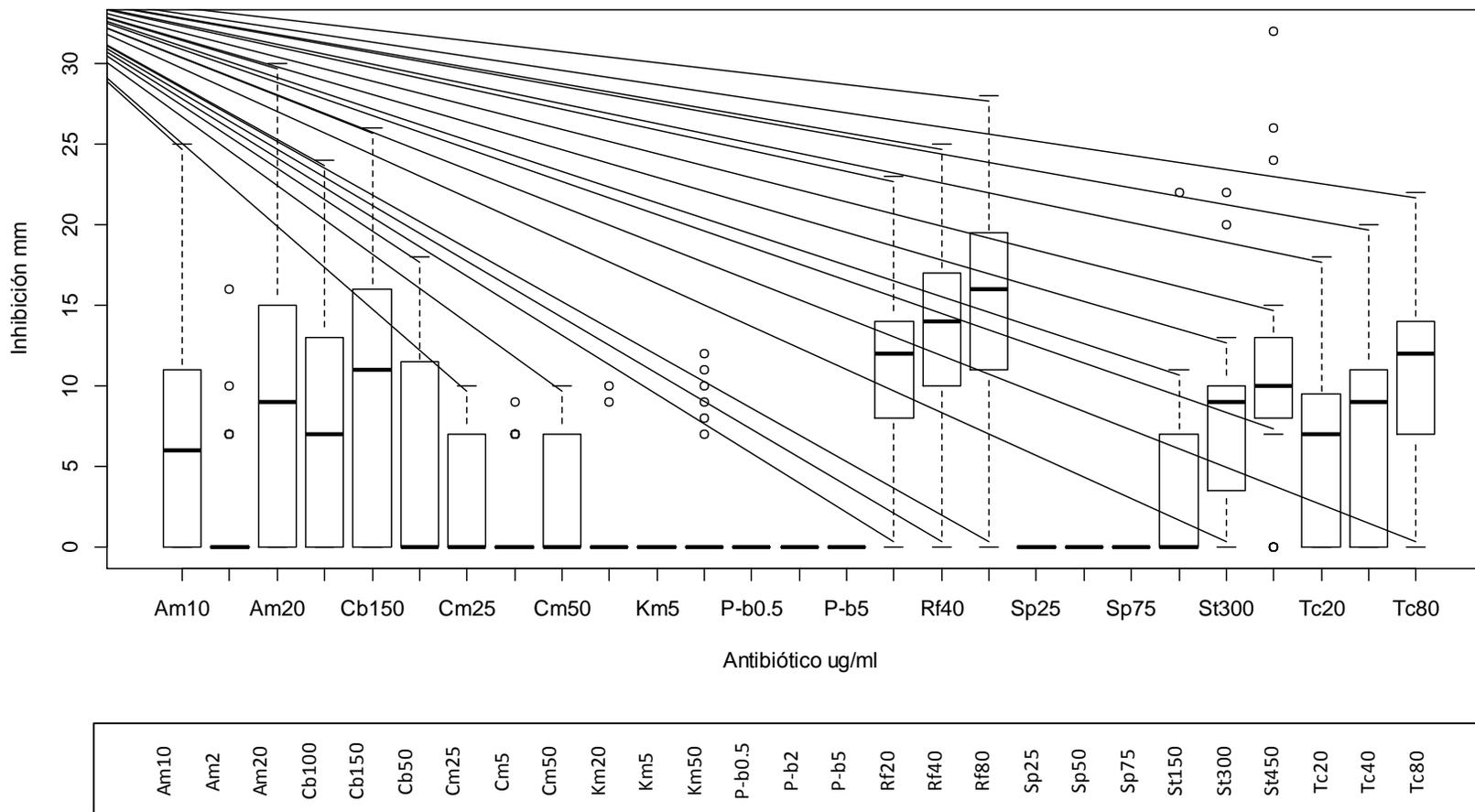


Figura 8| Efecto de inhibición de los antibióticos y las cepas probadas. Hay diferencias significativas con valores dentro del intervalo de confianza ($p < 0.05$) de Rifampicina (Rf 20,40,80 $\mu\text{g/ml}$) respecto a los otros antibióticos en el grado de inhibición en mm en las 31 cepas analizadas. Los antibióticos sin efecto inhibitorio alguno fueron Kanamicina (Km 5 $\mu\text{g/ml}$), Polimixina (P-b 0.5, 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$) y Espectinomicina (Sp) en las tres concentraciones, los cuales tuvieron una medición de cero. El *BoxPlot* fue construido utilizando el programa R 3.2.3.

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del muestreo de aire y la identificación por MALDI-TOF MS y secuenciación del gen de rRNA 16S, dio información acerca de la diversidad microbiana en el laboratorio de bioseguridad nivel 2. Estos resultados están de acuerdo con reportes previos (Fox et al., 2010; Gálvez-Martín et al., 2012; Papadopoulou et al., 2008; Shin et al., 2015), donde los microorganismos más frecuentemente encontrados en espacios cerrados pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Citricoccus*, *Arthrobacter* y *Bacillus*. Cabe aclarar que estas bacterias han sido detectadas en su mayoría en lugares diferentes a un laboratorio microbiológico como son: interiores de escuelas (Fox et al., 2010; Hospodsky et al., 2012; Leung and Chan, 2006), unidades farmacéuticas (Gálvez-Martín et al., 2012), hospitales (Augustowska and Dutkiewicz, 2006; Rathore et al., 2015) entre otros.

En esta estimación, esta contaminación es muy probable que proceda de las prácticas normales realizadas por los trabajadores, por ejemplo, la distribución y transporte de materiales y por la microbiota normal de los trabajadores, ya que se ha visto que bacterias como *Staphylococcus spp.* y *Micrococcus spp.* pueden ser liberadas al aire directamente de la piel (Hospodsky et al., 2012).

Es importante notar también que este análisis tiene altas probabilidades de presentar subestimaciones del grado verdadero de diversidad y abundancia de las comunidades microbianas en las muestras de aire que se obtuvieron, debido al hecho de que >99% de las especies de microorganismos no pueden ser crecidos en cultivos (Amann et al., 1995; Hugenholtz et al., 1998; Torsvik et al., 2002; Whitman et al., 1998). Por lo tanto, se conoce que hay grandes diferencias en el poder de detección microbiana entre métodos dependientes e independientes del cultivo utilizados en análisis de las comunidades microbianas del aire (Fierer et al., 2008; Yooseph et al., 2013).

Los resultados de este trabajo y otros muestran que diversas especies bacterianas son ubicuas en ambientes industriales (Lücking et al., 2013), además de ambientes muy variados. La identificación bacteriana en estudios anteriores ha

revelado, por ejemplo, que *Microbacterium* consta de diversas especies fisiológicamente versátiles que pueden ser aisladas de varios ambientes. *Microbacterium oleivorans* en particular ha sido asociada con la degradación de aceite crudo (Schippers et al., 2005). Por su parte *Bacillus litoralis*, *Bacillus koreensis* y *Bacillus subtilis*, bacterias Gram positivas con la capacidad de esporular (Madigan et al., 2009; Willey et al., 2011), representan bacterias benéficas utilizadas en la industria alimenticia y como rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (Kloepper et al., 2004; Lim et al., 2006; Yoon and Oh, 2005). *Agrococcus lahaulensis*, *Bacillus altitudinis*, *Citricoccus sp.*, *Chryseomicrobium imtechense*, *Planomicrobium chinense*, *Planococcus plakortidis*, *Pointibacter sp.*, *Sanguibacter marinus* y *Skermanella aerolata* han sido aislados de diversos ambientes, pero no ha sido demostrado aún usos industriales benéficos o de representar potencial de ser patógenos de humanos (Altenburger et al., 2002; Arora et al., 2011; Dai et al., 2005; Huang et al., 2005; Kaur et al., 2012; Mayilraj et al., 2006; Nedashkovskaya et al., 2005; Shivaji et al., 2006; Weon et al., 2007).

Sin embargo, otras especies encontradas en ambientes industriales están siendo cada vez más reconocidas como patógenos potenciales de humanos. Las especies de *Kocuria* son ubicuas en el ambiente y como microbiota normal de humanos (Szczerba, 2003). No obstante, *Kocuria rosea* y otras especies de *Kocuria* ha sido reportada como causante de abscesos cerebrales, colecistitis aguda, endocarditis infectiva, bacteremias relacionadas con catéteres y más recientemente, meningitis bacteriana aguda (Paul et al., 2015; Purty et al., 2013).

Bacillus pumilus tiene propiedades tóxicas (Hoult and Tuxford, 1991) y ha sido asociado con bacteremia en pacientes con cáncer y recientemente en casos de infecciones cutáneas (Tena et al., 2007).

Micrococcus luteus además del aire, puede ser aislado de piel humana, del suelo (Sims et al., 1986) y agua, con propiedades de inhibir el crecimiento de especies de *Vibrio* patógenas (Barcenal et al., 2015) y puede entrar a un estado latente en ambientes naturales que pueden permitir la supervivencia del microorganismo por periodos largos (Kaprelyants and Kell, 1993). A menudo encontrado en suelos contaminados, aceite, *M. luteus* ha sido usado en industrias

químicas y farmacéuticas (Mukamolova et al., 2002). Sin embargo, ha sido reportado como el agente causal en casos de abscesos intracraneales, neumonía, artritis séptica, endocarditis y meningitis (Fosse et al., 1985; Miltiadous and Elisaf, 2011).

De igual manera, las cepas de *Arthrobacter* están ampliamente distribuidas en el ambiente, especialmente en suelo, *Arthrobacter phenanthrenivorans* aislada por primera vez en 2009 de suelos contaminados y ahora en este trabajo del aire, es una bacteria de interés ambiental y de utilidad por su capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos como el fenantreno, un compuesto tóxico para el ambiente, como fuente de carbono en ausencia de carbohidratos (Kallimanis et al., 2009). Recientemente otras especies de *Arthrobacter* han sido aisladas de especímenes clínicos (Funke et al., 1996) y de fuentes veterinarias. *A. gandavensis* ha sido aislada de vacas lecheras con mastitis y de úteros de vaca (Storms et al., 2003). Las funciones de *A. gandavensis* como patógeno en esos ambientes aún no se ha determinado. *A. agilis*, antes llamada *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) (Koch et al., 1995), se ha reportado su capacidad para sintetizar compuestos que inhiben el crecimiento de ciertos hongos patógenos de plantas (Velázquez-Becerra et al., 2013). También se han aislado ciertas cepas de *A. agilis* de aguas heladas del mar Antártico con capacidad para producir bacterioruberina (compuestos carotenoides de C-50 (Fong et al., 2001) con importancia biotecnológica como fotoprotectores, no se ha aislado de muestras de aire. *Corynebacterium xerosis* es considerada como una bacteria comensal de la piel humana y de las membranas mucosas y ha sido también aislada de fuentes veterinarias, pero su rol potencial como un patógeno, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o intervenidos quirúrgicamente, no ha sido establecido (Vela et al., 2006). *Kytococcus sedentarius* es usualmente parte de la microbiota de la piel humana, y en raras ocasiones, ha sido asociada con infecciones severas, tal como queratolisis, y frecuentemente con peritonitis (Chaudhary and Finkle, 2010). Las especies de *Psychrobacter* y *Exiguobacterium* han sido aisladas del ambiente y no parecen tener relevancia clínica. Hay evidencia que sugiere podrían ser patógenos oportunistas y

que pueden causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Caspar et al., 2013; Deschaght et al., 2012; Pitt et al., 2007).

Muchas especies de *Pseudomonas* han recibido mucha atención por sus capacidades metabólicas particulares, tal como su habilidad para participar en la degradación de contaminantes del petróleo y otros compuestos orgánicos tóxicos (Barathi and Vasudevan, 2001; Das and Chandran, 2011; Dasgupta et al., 2013; Parales et al., 2000; Wasi et al., 2013) y para interactuar con metales tóxicos (Singh et al., 2011; Wasi et al., 2013). Otras especies son agentes causales de infecciones en plantas con relevancia en agricultura (Jones and Wildermuth, 2011). No obstante, algunas especies tal como *Pseudomonas stutzeri*, antes llamada *Pseudomonas perfectomarina* (Döhler et al., 1987), y *Pseudomonas aeruginosa* ha sido también aislada como patógeno oportunista de humanos (de Bentzmann and Plésiat, 2011; Lalucat et al., 2006).

Los staphylococos son el principal causante de infecciones adquiridas en ambientes hospitalarios (infecciones nosocomiales), y de brotes infecciosos en la comunidad (Lowy, 1998; Taubes, 2008). Las especies de *Staphylococcus* son la causa más común de bacteremias, endocarditis infectiva, piel y tejido blando, infecciones osteoarticulares, infecciones pleuropulmonares (David and Daum, 2010; Diekema et al., 2001; Tong et al., 2015). Desde que *S. aureus* fue reportado por primera vez como resistente a meticilina (MRSA) a principios de los 1960s (Jevons, 1961), se ha incrementado la tasa de resistencia a meticilina entre las especies de *Staphylococcus*, lo cual es causa de preocupación. *Staphylococcus cohnii* es usualmente parte de la microbiota normal de la piel humana (Kloos and Musselwhite, 1975; Schleifer and Kloos, 1975). Sin embargo, esta especie ha sido asociada recientemente con infecciones nosocomiales serias incluyendo bacteremia relacionada a catéteres y a prótesis quirúrgicas, colecistitis aguda, abscesos cerebrales, endocarditis, neumonía, infecciones del tracto urinario y artritis séptica, por lo que ahora considerado como un patógeno emergente (Soldera et al., 2013; Szewczyk et al., 2003). *Staphylococcus xylosus*, además de que ha sido descrito como agente causal de pielonefritis aguda (Tselenis-Kotsowilis et al., 1982) y otras patologías infecciosas, ha sido modelo de estudio de estrés nitrosativo

a través del análisis de transcriptomas (Vermassen et al., 2014). Es frecuente el aislamiento de *S. xylosus* de piel de animales y poco frecuente de piel humana (Nagase et al., 2002), así como de diversos alimentos como quesos y embutidos fermentados secos y otros productos de origen animal (Coton et al., 2010).

Considerando los resultados de los análisis de resistencia a antibióticos se pueden observar diversas respuestas interesantes. *Pseudomonas spp.* es un género de bacterias Gram negativas (Madigan et al., 2009; Willey et al., 2011), una característica notable, es su resistencia significativa a múltiples agentes antimicrobianos (Paterson, 2006). Esta resistencia ha sido mostrada como resultado de la presencia de múltiples mecanismos de resistencia, tal como sistemas de flujo de salida de tres componentes de amplia especificidad de sustrato (Aloush et al., 2006; Barbier and Wolff, 2010; Jude et al., 2004; Lalucat et al., 2006; Lambert, 2002). Es notable que en este trabajo *Pseudomonas sp.* PG39A y *Pseudomonas perfectomarina* PG12 (ahora *P. stutzeri*), fueron las cepas que mostraron los más altos niveles de resistencia a todos los antibióticos probados, entre ellos Rifampicina en su concentración más alta (80 µg/ml), la cual presentó cierto nivel de inhibición en todas las cepas restantes. Tattawasart et al., 1999 encontraron sensibilidad en cepas de *P. stutzeri* a Streptomina 10 µg, Kanamicina 30 µg, Tetraciclina 30 µg, Rifampicina 5 µg (solo una cepa fue resistente) y ampicilina 10 µg, en este análisis encontramos resistencia a todos estos antibióticos y es importante notar que sucedió a concentraciones más altas que en el reporte de 1999 (Streptomina 450 µg, Kanamicina 50 µg, Tetraciclina 80 µg, Rifampicina 80 µg y Ampicilina 20 µg). Lalucat et al., 2006 mencionan que *P. stutzeri* está ampliamente distribuida en el ambiente ocupando diversos nichos ecológicos, entre ellos como un patógeno oportunista en humanos. En muchos estudios se ha mostrado que *P. stutzeri* es sensible a muchos más agentes antimicrobianos que *P. aeruginosa* (Tattawasart et al., 1999), lo que ha sido explicado por el hecho de que *P. stutzeri* es poco frecuente en ambientes hospitalarios, por lo tanto, no ha estado en contacto frecuente con agentes quimioterapéuticos antibacterianos que induzcan la selección de cepas resistentes (Lalucat et al., 2006). Sin embargo, trabajos anteriores reportan

resistencia en cepas de *P. stutzeri* muy parecida a *P. aeruginosa*, ambas aisladas de pacientes inmunocomprometidos (Manfredi et al., 2000), por el hecho de que los pacientes son altamente medicados con antibióticos y hospitalizados por periodos prolongados.

Por su parte, *Staphylococcus cohnii* PG31, *S. xylosus* PG18 y *S. aureus* PG33A, cocos *Gram* positivos no esporulados (Madigan et al., 2009; Willey et al., 2011), mostraron perfiles similares de resistencia. Después de las cepas PG39A y PG12, estas tres especies mostraron los niveles de sensibilidad más bajos observados, ya que PG31 y PG18 solamente presentaron sensibilidad para Rifampicina a 40 y 80 µg/ml y a Streptomina a 450 µg/ml; PG33A únicamente fue sensible a Rifampicina. De acuerdo con nuestros resultados, *S. xylosus* ha sido aislado de muestras clínicas y ha mostrado resistencia también a Tetraciclina además para Penicilina, Gentamicina y Eritromicina (Pinna et al., 1999), otros trabajos sobre análisis de staphylococos en sistemas de transporte público, han mostrado que *S. cohnii* y *S. xylosus* son resistentes a Tetraciclina 30 µg y a Ampicilina 10 µg (Yeh et al., 2011). Koksall et al., 2009 muestran cepas resistentes a Cloranfenicol 30 µg, mientras que en nuestro análisis el 100% de las cepas aisladas resistieron a 50 µg/ml, incluidos los staphylococos. *Staphylococcus aureus* es una bacteria multiresistente a antibióticos, ya que a través del tiempo ha ido adquiriendo resistencia a cada vez más antibióticos (Koksall et al., 2009; Xia et al., 2013). En 1945 se observó resistencia de *S. aureus* a Penicilina (Plough, 1945). En 1947 la FDA aprobó la utilización de Streptomina para tratar infecciones causadas por este patógeno, en este mismo año se reportó resistencia a este fármaco natural (Taubes, 2008). En 1952 se aprobó el uso de Tetraciclina, en 1957 se observó resistencia (Hein, 1957). En 1958 se comenzó a usar Vancomicina, en 1996 se encontró resistencia intermedia (VISA) (Centers for Disease Control and Prevention, 1997; Taubes, 2008), sin embargo en 2002, se encontró resistencia total (VRSA) (Centers for Disease Control and Prevention, 2002; Srinivasan et al., 2002). La Meticilina fue introducida en 1959, y sorprendentemente en 1961 se reportó *S. aureus* resistente a Meticilina (MRSA) (Barber, 1961). En 1967 se aprobó el uso de

Gentamicina, y en 1970 se observó resistencia (Lacey and Mitchell, 1969; Taubes, 2008).

S. aureus fue sensible solamente a Rifampicina, aunque trabajos anteriores han reportado resistencia, debido a mutaciones cromosómicas en el gen *rpoB* resultando en substituciones de aminoácidos en la subunidad β de la RNA polimerasa que confieren resistencia (Aubry-Damon et al., 1998; Goldstein, 2014; Jansen van Rensburg et al., 2012). Por otra parte, esta resistencia mostrada por *Pseudomonas* a Rifampicina pudiera ser inducida por genes que codifican bombas de flujo, contenidos en plásmidos como han sido caracterizados en *P. fluorescens* (Chandrasekaran and Lalithakumari, 1998; Goldstein, 2014).

En este trabajo, Rifampicina fue el antibiótico que mostró un mayor efecto de sensibilidad en el total de las cepas probadas, seguido de Tetraciclina y Carbenicilina. Rifampicina ha sido considerado uno de los antibióticos más potentes y de amplio espectro (Sensi, 1983), inhibe la síntesis de mRNA (transcripción) (Campbell et al., 2001). La Tetraciclina es un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas (traducción), también representa uno de los agentes antimicrobianos con mayor espectro de acción contra *Gram* positivos y *Gram* negativos, así como para bacterias atípicas como chlamydias, mycoplasmas y rickettsias (Chopra and Roberts, 2001). *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, y demás bacterias patógenas, han sido reportadas como resistentes a Tetraciclina debido a la adquisición de genes de resistencia *tet* que codifican para proteínas de eflujo, proteínas de protección ribosomal, enzimas que inactivan las moléculas de Tetraciclina y otros mecanismos no reconocidos (Chopra and Roberts, 2001), en este análisis nueve cepas fueron resistentes incluidas *Pseudomonas* PG12 y PG39A; *Staphylococcus* PG18, PG31 y PG33A. Carbenicilina por su parte, es una Penicilina semisintética (Calvo and Martínez-Martínez, 2009) que inhibe la síntesis de pared celular. Existen mecanismos bien conocidos de resistencia tales como la producción de enzimas β -lactamasas que hidrolizan los antibióticos haciéndolos inactivos, síntesis de transpeptidasas insensibles a β -lactámicos, y la expulsión de las moléculas del antibiótico mediante bombas de eflujo en bacterias *Gram* negativas al medio extracelular (Wilke et al., 2005).

Diversos sistemas de resistencia a los antibióticos, tales como plásmidos, transposones o determinantes cromosomales son bien conocidos en muchos aislados bacterianos (Bonnet, 2004; Couturier et al., 1988), donde resguardan genes que confieren resistencia a antibióticos (Aleksun and Levy, 2007; Nikaido, 2010) . De esta manera, la exposición a uno o más antibióticos puede seleccionar los microorganismos resistentes para diversos antibióticos. En realidad, la caracterización genética da una idea importante para entender el repertorio de determinantes genéticos de una cepa bacteriana multirresistente.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo, se aislaron bacterias de un laboratorio de bioseguridad nivel 2. Se evaluó MALDI-TOF MS como un método para identificación exacta y rápida de especies de bacterias ambientales. Estos resultados corroboraron la alta capacidad de tipificación de MALDI-TOF MS en comparación con el uso de secuenciación de rDNA 16S (Bizzini et al., 2011; Cherkaoui et al., 2010; Mellmann et al., 2008). Se aislaron cepas de bacterias que se han encontrado frecuentemente en hospitales, salones de clases y otros lugares cerrados, las cuales representan bacterias patógenas oportunistas y además resistentes a antibióticos. Estos microorganismos resistentes a múltiples antibióticos pueden ser útiles como indicadores de riesgo potencial en la salud durante un programa de monitoreo ambiental y para dar un reservorio masivo de información genética con implicaciones importantes en la transferencia de múltiples determinantes de resistencia en bacterias patógenas.

10. PERSPECTIVAS

§ Caracterización detallada de la resistencia por detección molecular de determinantes genéticos, comparación en cultivos heteroresistentes.

§ Determinar posibles casos de procesos de transferencia horizontal de genes de resistencia.

§ Determinar el origen de las cepas atípicas, es decir, de las menos frecuentes que no están presentes en la microbiota humana y determinar qué sustratos de crecimiento están presentes para su desarrollo.

§ Tipificación de las capacidades metabólicas de las cepas aisladas con fines de encontrar potencial en el uso biotecnológico.

§ Análisis de Genómica comparativa por secuenciación del genoma de cepas de interés.

§ Ampliar el diagnóstico microbiológico al análisis de hongos contaminantes.

11. REFERENCIAS

- Abonnenc, M., Qiao, L., Liu, B., Girault, H.H., 2010. Electrochemical aspects of electrospray and laser desorption/ionization for mass spectrometry. *Annual review of analytical chemistry* 3, 231–254. doi:10.1146/annurev.anchem.111808.073740
- Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M.F., 2004. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *Journal of Bacteriology* 186, 2629–2635. doi:10.1128/JB.186.9.2629-2635.2004
- Adelberg, E.A., Austrian, R., Barkley, W., Burnet, J., Fleming, D., Fuchs, R., Ginsberg, H., Goldman, R., Hughes, J., Mikell, W., Richardson, J., Schmidt, J., Smith, J.W., Walton, T.E., 1989. *Biosafety in the Laboratory: Prudent Practices for Handling and Disposal of Infectious Materials*, 1st ed. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207. doi:10.1038/nature01511
- Alanis, A.J., 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research* 36, 697–705.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2014. *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed. Garland Science, N. Y.
- Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128, 1037–1050. doi:10.1016/j.cell.2007.03.004
- Alispahic, M., Hummel, K., Jandreski-Cvetkovic, D., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., Hess, M., Hess, C., 2010. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry analysis. *Journal of Medical Microbiology* 59, 295–301. doi:10.1099/jmm.0.016576-0

- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 8, 251–259.
- Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y., 2006. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 50, 43–48. doi:10.1128/AAC.50.1.43
- Altenburger, P., Kämpfer, P., Schumann, P., Steiner, R., Lubitz, W., Busse, H.-J., 2002. Actinobacterium Isolated From a Medieval Wall Painting 2095–2100. doi:10.1099/ijs.0.02309-0.Abbreviations
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation . *Microbiological Reviews* 59, 143–169. doi:10.1016/j.jip.2007.09.009
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* 8, 260–272.
- Arora, P.K., Chauhan, a., Pant, B., Korpole, S., Mayilraj, S., Jain, R.K., 2011. *Chryseomicrobium imtechense* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Planococcaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 1859–1864. doi:10.1099/ijs.0.023184-0
- Aubry-Damon, H., Soussy, C.-J., Courvalin, P., 1998. Characterization of Mutations in the *rpoB* Gene That Confer Rifampin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 42, 2590–2594.
- Augustowska, M., Dutkiewicz, J., 2006. Variability of airborne microflora in a hospital ward within a period of one year. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13, 99–106. doi:13099 [pii]
- Awosika, S.A., Alojuba, F.A., Amusa, N.A., 2012. Microbiological assessment of indoor air of a teaching hospital in Nigeria. *Asian Pac J Trop Biomed* 2, 465–468.

- Barathi, S., Vasudevan, N., 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International* 26, 413–416. doi:10.1016/S0160-4120(01)00021-6
- Barber, M., 1961. Methicillin-resistant staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 385–393. doi:10.1136/jcp.14.4.385
- Barbier, F., Wolff, M., 2010. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*: Vers l'impasse thérapeutique? *Medecine/Sciences* 26, 960–968.
- Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T., 2008. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 5402–5407. doi:10.1128/AEM.02689-07
- Barcenal, A.R.B., Traifalgar, R.F.M., Corre-Jr, V.L., 2015. Anti-*Vibrio harveyi* Property of *Micrococcus luteus* Isolated from Rearing Water under Biofloc Technology Culture System. *Current Research in Bacteriology* 8, 26–33. doi:10.3923/crb.2015.26.33
- Bennett, P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* 153, 347–357.
- Bizzini, A., Jatou, K., Romo, D., Bille, J., Prod'homme, G., Greub, G., 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *Journal of clinical microbiology* 49, 693–696. doi:10.1128/JCM.01463-10
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J. V., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 13, 42–51. doi:10.1038/nrmicro3380
- Bonetta, S., Bonetta, S., Moso, S., Sampo, S., Carraro, E., 2010. Assessment of

- microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system. *Environmental Monitoring and Assessment* 161, 473–483.
- Bonnet, R., 2004. MINIREVIEW Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases : the CTX-M Enzymes 48, 1–14. doi:10.1128/AAC.48.1.1
- Boyce, J.M., Potter-Bynoe, G., Chenevert, C., King, T., 1997. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Possible infection control implications. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 18, 622–627.
- Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Parker, J.P.M., Zubietta, I.X., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., 2007. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 299–304.
- Budecka, A., Kunicka-Styczyńska, A., 2014. Microbiological contaminants in cosmetics – isolation and characterization. *Biotechnol Food Sci* 78, 15–23.
- Calvo, J., Martínez-Martínez, L., 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27, 44–52. doi:10.1016/j.eimc.2008.11.001
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S.A., 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* 104, 901–912. doi:10.1016/S0092-8674(01)00286-0
- Caspar, Y., Recule, C., Pouzol, P., Lafeuillade, B., Mallaret, M.R., Maurin, M., Croize, J., 2013. *Psychrobacter areneus* bacteremia after blood transfusion, France. *Emerg Infect Dis* 19, 1118–1120. doi:10.3201/eid1907.121599
- CDC, 2016. Antibiotic / Antimicrobial Resistance [WWW Document]. Centers for Disease Control and Prevention. URL <http://www.cdc.gov/drugresistance/>
- Centers for Disease Control and Prevention, 2013. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013. U.S. Department of health and human services, USA.

- Centers for Disease Control and Prevention, C., 2002. Staphylococcus aureus resistant to vancomycin--United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 51, 565–567.
- Centers for Disease Control and Prevention, C., 1997. Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin--United States, 1997. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 46, 851.
- Chandrasekaran, S., Lalithakumari, D., 1998. Plasmid-mediated rifampicin resistance in Pseudomonas fluorescens. J.Med.Microbiol. 47, 197–200.
- Chaudhary, D., Finkle, S.N., 2010. Peritoneal Dialysis-Associated Peritonitis Due to Kytococcus Sedentarius. Peritoneal Dialysis International 30, 251–252. doi:10.3747/pdi.2009.00082
- Chen, L.F., Chopra, T., Kaye, K.S., 2009. Pathogens Resistant to Antibacterial Agents. Infect Dis Clin 23, 817–845.
- Cherkaoui, A., Hibbs, J., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., Schrenzel, J., 2010. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level □ 48, 1169–1175. doi:10.1128/JCM.01881-09
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews 65, 232–260. doi:10.1128/MMBR.65.2.232
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Research 42, 633–642. doi:10.1093/nar/gkt1244
- Coton, E., Desmonts, M.H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christieans, S., Donnio, P.Y., Lebert, I., Talon, R., 2010. Biodiversity of Coagulase-Negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing

- environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology* 137, 221–229. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.023
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., Maas, W.K., 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological reviews* 52, 375–395.
- Dai, X., Wang, Y.-N., Wang, B.-J., Shuang-Jiang, L., Zhou, Y.-G., 2005. *Planomicrobium chinense* sp. nov., isolated from coastal sediment, and transfer of *Planococcus psychrophilus* and *Planococcus alkanoclasticus* to *Planomicrobium* as *Planomicrobium psychrophilum* comb. nov. and *Planomicrobium alkanoclasticum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 699–702. doi:10.1099/ijs.0.63340-0
- Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international* 2011, 941810. doi:10.4061/2011/941810
- Dasgupta, D., Ghosh, R., Sengupta, T.K., 2013. Biofilm-mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated pseudomonas species. *ISRN biotechnology* 2013, 250749. doi:10.5402/2013/250749
- David, M.Z., Daum, R.S., 2010. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 616–687. doi:10.1128/CMR.00081-09
- Davies, J., 1994. Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. *Science* 264, 375–382.
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, 417–433.
- de Bentzmann, S., Plésiat, P., 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environmental Microbiology* 13, 1655–1665. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02469.x

- DeLong, E.F., 2004. Microbial population genomics and ecology: the road ahead. *Environmental Microbiology* 6, 875–878.
- Deschaght, P., Janssens, M., Vaneechoutte, M., Wauters, G., 2012. Psychrobacter isolates of human origin, other than Psychrobacter phenylpyruvicus, are predominantly Psychrobacter faecalis and Psychrobacter pulmonis, with emended description of P. faecalis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 671–674. doi:10.1099/ijs.0.032631-0
- Diekema, D.J., Pfaller, M. a, Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R.N., Beach, M., 2001. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32 Suppl 2, S114–S132. doi:10.1097/00019048-200106000-00032
- Döhler, K., Huss, V.A.R., Zumft, W.G., 1987. Transfer of Pseudomonas perfectomarina Baumann , Bowditch , Baumann , and Beaman 1983 to Pseudomonas stutzeri (Lehmann and Neumann 1896) Sijderius 1946. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1–3.
- Dubois, D., Leysse, D., Chacornac, J.P., Kostrzewa, M., Schmit, P.O., Talon, R., Bonnet, R., Delmas, J., 2010. Identification of a variety of Staphylococcus species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 941–945. doi:10.1128/JCM.00413-09
- Duncan, M.W., Roder, H., Hunsucker, S.W., 2008. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 7, 355–370. doi:10.1093/bfgp/eln041
- Eguiarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X., 2007. *Ecología Molecular*, 1ra ed. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México DF.
- Falagas, M.E., Bliziotis, I.A., 2007. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the

- dawn of the post-antibiotic era? *International Journal of Antimicrobial Agents* 29, 630–636.
- Fenselau, C., Anhalt, J.P., 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 47, 219–225.
- Fierer, N., Liu, Z., Rodríguez-Hernández, M., Knight, R., Henn, M., Hernandez, M.T., 2008. Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 200–207. doi:10.1128/AEM.01467-07
- Fogel, G.B., Collins, C.R., Li, J., Brunk, C.F., 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbial Ecology* 38, 93–113. doi:10.1007/s002489900162
- Fong, N.J.C., Burgess, M.L., Barrow, K.D., Glenn, D.R., 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 750–756. doi:10.1007/s002530100739
- Fosse, T., Peloux, Y., Granthil, C., Toga, B., Bertrando, J., Sethian, M., 1985. Meningitis due to *Micrococcus luteus*. *Infection* 13, 280–1. doi:10.1007/BF01645439
- Fox, K., Fox, A., Elßner, T., Feigley, C., Salzberg, D., 2010. MALDI-TOF mass spectrometry speciation of staphylococci and their discrimination from micrococci isolated from indoor air of schoolrooms. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 917. doi:10.1039/b925250a
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J., 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2461–2470. doi:10.1128/AEM.02272-07
- Funke, G., Hutson, R.A., Bernard, K.A., Pfyffer, G.E., Wauters, G., Collins, M.D., 1996. Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of

- Arthrobacter cumminsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2356–2363.
- Gálvez-Martín, P., Bermejo-González, M., Ruiz-Martínez, A., Gallardo-Lara, V., Clares-Naveros, B., 2012. Isolation and characterization of the environmental bacterial and fungi contamination in a pharmaceutical unit of mesenchymal stem cell for clinical use. *Biologicals* 40, 330–337. doi:10.1016/j.biologicals.2012.06.002
- Gelpi, E., 2008. From large analogical instruments to small digital black boxes: 40 years of progress in mass spectrometry and its role in proteomics. Part I, 1965-1984. *J Mass Spectrom* 43, 419–135.
- Giebel, R., Worden, C., Rust, S.M., Kleinheinz, G.T., Robbins, M., Sandrin, T.R., 2010. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges., 1st ed, *Advances in applied microbiology*. Elsevier Inc. doi:10.1016/S0065-2164(10)71006-6
- Goldstein, B.P., 2014. Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of antibiotics* 1–6. doi:10.1038/ja.2014.107
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th ed. W. H. Freeman, N Y.
- Hall, B.G., 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution* 30, 1229–1235. doi:10.1093/molbev/mst012
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. doi:citeulike-article-id:691774
- Hayleeyesus, S.F., Manaye, A.M., 2014. Microbiological Quality of Indoor Air in University Libraries. *Asian Pac J Trop Biomed* 4, 312–317.
- Hein, H., 1957. Studies on resistance of staphylococci to penicillin, streptomycin, oxytetracycline, tetracycline, chloramphenicol, neomycin, bacitracin, tyrothricin,

- nebacetin & tyrosolvin aerosol. *Dtsch Med Wochenschr* 6, 1475–1480.
- Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., Piddock, L.J. V, 2015. Antimicrobials: access and sustainable effectiveness 2. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. Series 1–12.
- Hospodsky, D., Qian, J., Nazaroff, W.W., Yamamoto, N., Bibby, K., Rismani-Yazdi, H., Peccia, J., 2012. Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034867
- Hoult, B., Tuxford, A.F., 1991. Toxin production by *Bacillus pumilus*. *Journal of Clinical Pathology* 44, 455–458.
- Huang, Y., Dai, X., He, L., Wang, Y.-N., Wang, B.-J., Liu, Z., Liu, S.-J., 2005. *Sanguibacter marinus* sp. nov., isolated from coastal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1755–1758. doi:10.1099/ijs.0.63471-0
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., Stetter, K.O., 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417, 63–67.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180, 4765–4774. doi:0021-9193/98/\$04.00+0
- Jansen van Rensburg, M.J., Whitelaw, A.C., Elisha, B.G., 2012. Genetic basis of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* suggests clonal expansion in hospitals in Cape Town, South Africa. *BMC Microbiology* 12, 1–7. doi:10.1186/1471-2180-12-46
- Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N., 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 945–952.
- Jevons, M.P., 1961. “Celbenin”-resistant staphylococci. *BMJ* 123, 124–125.

doi:10.1136/bmj.2.5213.1668

Johnson, A.P., Cleaves, H.J., Dworkin, J.P., Glavin, D.P., Lazcano, A., Bada, J.L., 2008. The Miller Volcanic Discharge Experiment. *Science* 322, 404.

Jones, A.M., Wildermuth, M.C., 2011. The Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Has Three High-Affinity Iron-Scavenging Systems Functional under Iron Limitation Conditions but Dispensable for Pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 193, 2767–2775. doi:10.1128/JB.00069-10

Jones, A.P., 1999. Indoor air quality and health. *Atmospheric Environment* 33, 4535–4564. doi:10.1016/S1352-2310(99)00272-1

Jones, R.N., Pfaller, M.A., 1998. Bacterial Resistance: A Worldwide Problem. *DIAGN MICROBIOL INFECT DIS* 31, 379–388.

Jude, F., Arpin, C., Brachet-Castang, C., Capdepuy, M., Caumette, P., Quentin, C., 2004. TbtABM, a multidrug efflux pump associated with tributyltin resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS Microbiology Letters* 232, 7–14. doi:10.1016/S0378-1097(04)00012-6

Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D., 2004. MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. *Molecular biotechnology* 26, 147–164. doi:10.1385/MB:26:2:147

Kallimanis, A., Kavakiotis, K., Perisynakis, A., Spröer, C., Pukall, R., Drinas, C., Koukkou, A.I., 2009. *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 275–279. doi:10.1099/ijs.0.000984-0

Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., 1993. Dormancy in Stationary-Phase Cultures of *Micrococcus luteus*: Flow Cytometric Analysis of Starvation and Resuscitation. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3187–3196.

Kaur, I., Das, a. P., Acharya, M., Klenk, H.-P., Sree, a., Mayilraj, S., 2012. *Planococcus plakortidis* sp. nov., isolated from the marine sponge *Plakortis*

- simplex (Schulze). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 883–889. doi:10.1099/ijs.0.029967-0
- Kaye, K.S., Engemann, J.J., Fraimow, H.S., Abrutyn, E., 2004. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin N Am* 18, 467–511.
- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M., 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1328–1333. doi:10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., Zhang, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259–1266.
- Kloos, W.E., Musselwhite, M.S., 1975. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Applied microbiology* 30, 381–385.
- Koch, C., Schumann, P., Stackebrandt, E., 1995. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the Genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and Emendation of the Genus *Arthrobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 837–839.
- Koksal, F., Yasar, H., Samasti, M., 2009. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiological Research* 164, 404–410. doi:10.1016/j.micres.2007.03.004
- Krishnamurthy, T., Ross, P.L., 1996.). Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 10, 1992–1996.
- Krishnamurthy, T., Ross, P.L., Rajamani, U., 1996. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10, 883–888.
- Lacey, R.W., Mitchell, A.A.B., 1969. GENTAMICIN-RESISTANT

STAPHYLOCOCCUS AUREUS. The lancet 294, 1495–1496.

Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., Palleroni, N.J., 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 70, 510–547. doi:10.1128/MMBR.00047-05

Lambert, P.A., 2002. Mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med 95, S22–26.

Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 6955–6959.

Lay Jr., J.O., Holland, R.D., 2000. Rapid identification of bacteria based on spectral patterns using MALDI-TOFMS. Methods Mol Biol 146, 461–487. doi:10.1385/1-59259-045-4:461

Lemmen, S.W., Häfner, H., Zolldann, D., Stanzel, S., Lütticken, R., 2004. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. J Hosp Infect 56, 191–197.

Leung, M., Chan, A.H.S., 2006. Control and management of hospital indoor air quality. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research 12, SR17–R23.

Levin, B.R., Rozen, D.E., 2006. Non-inherited antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology 4, 556–563.

Levy, S.B., 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49, 25–30.

Levy, S.B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Medicine Supplement 10, 122–129.

Lim, J.-M., Jeon, C.O., Lee, J.-C., Ju, Y.J., Park, D.-J., Kim, C.-J., 2006. *Bacillus koreensis* sp. nov., a spore-forming bacterium, isolated from the rhizosphere of

- willow roots in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 59–63. doi:10.1099/ijs.0.63701-0
- Lorenz, M.G., Wackernagel, W., 1994. Bacterial gene-transfer by natural genetic-transformation in the environment. *Microbiological reviews* 58, 563–602.
- Lowy, F.D., 1998. Staphylococcus Aureus Infections. *New England Journal of Medicine* 339, 520–532. doi:10.1056/NEJM199808203390806
- LPSN, 2016. List of prokaryotic names with standing in nomenclature [WWW Document]. LPSN News.
- Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., Ehling-Schulz, M., 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 166, 270–279. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P. V, Clarck, D.P., 2009. Brock: Biology of Microorganisms, 12th ed. Pearson Benjamin Cummings, S.F. Ca, USA.
- Maier, T., Klepel, S., Renner, U., Kostrzewa, M., 2006. Fast and reliable MALDI-TOF MS–based microorganism identification. *Nature Methods* 3. doi:10.1038/nmeth870
- Manfredi, R., Nanetti, A., Ferri, M., Chiodo, F., 2000. Pseudomonas spp. complications in patients with HIV disease: an eight-year clinical and microbiological survey. *Eur J Epidemiol* 16, 111–118.
- Mayilraj, S., Suresh, K., Schumann, P., Kroppenstedt, M.R., Saini, H.S., 2006. *Agrococcus lahaulensis* sp. nov., isolated from a cold desert of the Indian Himalayas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1807–1810. doi:10.1099/ijs.0.64247-0
- Medini, D., Serruto, D., Parkhill, J., Relman, D.A., Donati, C., Moxon, R., Falkow, S., Rappuoli, R., 2008. Microbiology in the post-genomic era. *Nature reviews. Microbiology* 6, 419–430. doi:10.1038/nrmicro1901

- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., Lasala, P., Kostrzewa, M., Harmsen, D., 2008. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria 46, 1946–1954. doi:10.1128/JCM.00157-08
- Messi, P., Sabina, C., Anacarso, I., Condo, C., Iseppi, R., Stefani, S., Neiderhausern, S., Bondi, M., 2015. Prevalence of multi-drug-resistant (MDR) bacteria in air samples from indoor and outdoor environments. *Aerobiology* 31, 381–387.
- Miltiados, G., Elisaf, M., 2011. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports* 5, 251. doi:10.1186/1752-1947-5-251
- Mukamolova, G. V., Turapov, O.A., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M., 2002. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Molecular Microbiology* 46, 611–621. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03183.x
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S., Kawano, J., 2002. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 64, 245–250. doi:10.1292/jvms.64.245
- Nedashkovskaya, O.I., Kim, S.B., Suzuki, M., Shevchenko, L.S., Lee, M.S., Lee, K.H., Park, M.S., Frolova, G.M., Oh, H.W., Bae, K.S., Park, H.-Y., Mikhailov, V. V., 2005. *Pontibacter actiniarum* gen. nov., sp. nov., a novel member of the phylum “Bacteroidetes”, and proposal of *Reichenbachiella* gen. nov. as a replacement for the illegitimate prokaryotic generic name *Reichenbachia* Nedashkovskaya et al. 2003. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2583–2588. doi:10.1099/ijs.0.63819-0
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, N. Y.

- Nercessian, O., Fouquet, Y., Pierre, C., Prieur, D., Jeanthon, C., 2005. Diversity of Bacteria and Archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* 7, 698–714.
- Neu, H.C., 1992. The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science* 257, 1064–1073.
- Nikaido, H., 2010. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem.* 78, 119–146. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.Multidrug
- Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299–304.
- OMS, 2005. *Manual De Bioseguridad En El Laboratorio*, 3rd ed. OMS, Malta.
- Papadopoulou, C., Economou, V., Sakkas, H., Gousia, P., Giannakopoulos, X., Dontorou, C., Filioussis, G., Gessouli, H., Karanis, P., Leveidiotou, S., 2008. Microbiological quality of indoor and outdoor swimming pools in Greece: Investigation of the antibiotic resistance of the bacterial isolates. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 211, 385–397. doi:10.1016/j.ijheh.2007.06.007
- Parales, R.E., Ditty, J.L., Harwood, C.S., 2000. Toluene-Degrading Bacteria Are Chemotactic towards the Environmental Pollutants Benzene , Toluene , and Trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4098–4104.
- Pasquarella, C., Pitzurra, O., Savino, a., 2000. The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection* 46, 241–256. doi:10.1053/jhin.2000.0820
- Paterson, D.L., 2006. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin.Infect.Dis.* 43, S43–S48. doi:10.1086/504476
- Paul, M., Gupta, R., Khush-Whaha, S., Thakur, R., 2015. *Kocuria rosea* : An emerging pathogen in acute bacterial meningitis- Case report. *Journal of Microbiology and Antimicrobial Agents* 1, 4–7.

- Pechman, K.J., Woese, C.R., 1972. Characterization of the primary structural homology between the 16s ribosomal RNAs of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium* by oligomer cataloging. *J. Mol. Evol.* 1, 230–240.
- Pinna, A., Zanetti, S., Sotgiu, M., Sechi, L.A., Fadda, G., Carta, F., 1999. Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *The British journal of ophthalmology* 83, 771–773. doi:10.1136/bjo.83.7.771
- Pitt, T.L., Malnick, H., Shah, J., Chattaway, M.A., Keys, C.J., Cooke, F.J., Shah, H.N., 2007. Characterisation of *Exiguobacterium aurantiacum* isolates from blood cultures of six patients. *Clinical Microbiology and Infection* 13, 946–948. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01779.x
- Plough, H.H., 1945. Penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and its clinical implications. *American Journal of Clinical Pathology* 15, 446–451.
- Purty, S., Saranathan, R., Prashanth, K., Narayanan, K., Asir, J., Sheela Devi, C., Kumar Amarnath, S., 2013. The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. *Emerging Microbes & Infections* 2, e71. doi:10.1038/emi.2013.71
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Janssen, P.H., Hippe, H., 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 7308(T) contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology*. *Microbiology* 142, 2087–2095.
- Rathore, L., Khatri, P.K., Chandora, A., Meena, S., Bora, A., 2015. Original Research Article Microbial Profile and Antibigram of Air Contamination in Hospital Wards of a Tertiary Care Hospital , Western Rajasthan , India 4, 40–46.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25, 39–67.
- Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Mayer, L.W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S., Popovic, T., 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool

- for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases* 8, 1117–1123. doi:10.3201/eid0810.020391
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., N.Y.
- Santos-Pontes, D., Lima-Bittencourt, C.I., Chartone-Souza, E., Amaral Nascimento, A.M., 2007. Molecular approaches: Advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34, 463–473. doi:10.1007/s10295-007-0219-3
- Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., Kostrzewa, M., Geider, K., 2008. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. *PLoS ONE* 3, e2843. doi:10.1371/journal.pone.0002843
- Sauer, S., Kliem, M., 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat.Rev.Microbiol.* 8, 74–82. doi:10.1038/nrmicro2243
- Scaltriti, S., Cencetti, S., Rovesti, S., Marchesi, I., Bargellini, a., Borella, P., 2007. Risk factors for particulate and microbial contamination of air in operating theatres. *Journal of Hospital Infection* 66, 320–326. doi:10.1016/j.jhin.2007.05.019
- Schippers, A., Bosecker, K., Spröer, C., Schumann, P., 2005. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 655–660. doi:10.1099/ijs.0.63305-0
- Schleifer, K.H., Kloos, W.E., 1975. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Descriptions *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylos*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 25, 50–61. doi:10.1099/00207713-25-1-62

- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S., 1986. Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Population Genetics and Systematics. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 873–884. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Seng, P., Drancourt, M., Gourié, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J.M., Raoult, D., 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49, 543–551. doi:10.1086/600885
- Sensi, P., 1983. History of the development of rifampin. *Rev. Infect. Dis.* 3, 402–406.
- Sergent, A.P., Slekovec, C., Pauchot, J., Jeunet, L., Bertrand, X., Hocquet, D., Pazart, L., Talon, D., 2012. Bacterial contamination of the hospital environment during wound dressing change. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 98, 441–445.
- Shin, S.-K., Kim, J., Ha, S., Oh, H.-S., Chun, J., Sohn, J., Yi, H., 2015. Metagenomic insights into the bioaerosols in the indoor and outdoor environments of childcare facilities. *PLoS ONE* 10, e0126960. doi:10.1371/journal.pone.0126960
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G.S.N., Dutt, C.B.S., Wainwright, M., Narlikar, J. V., Bhargava, P.M., 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1465–1473. doi:10.1099/ijs.0.64029-0
- Sims, G.K., Sommers, L.E., Konopka, A., 1986. Degradation of pyridine by *Micrococcus luteus* isolated from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 963–968.
- Singh, J.S., Abhilash, P.C., Singh, H.B., Singh, R.P., Singh, D.P., 2011. Genetically engineered bacteria: An emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. *Gene* 480, 1–9. doi:10.1016/j.gene.2011.03.001

- Soldera, J., Nedel, W.L., Cerveira-Cardoso, P.R., D'Azevedo, P.A., 2013. Bacteremia due to *Staphylococcus cohnii* ssp. *urealyticus* caused by infected pressure ulcer: case report and review of the literature. *São Paulo medical journal = Revista paulista de medicina* 131, 59–61.
- Sommer, M.O., Dantas, G., Church, G.M., 2009. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 325, 1128–1131.
- Srinivasan, A., Dick, J.D., Perl, T.M., 2002. Vancomycin Resistance in *Staphylococci*. *Vancomycin Resistance in Staphylococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 430–438. doi:10.1128/CMR.15.3.430
- Stewart, F.J., Cavanaugh, C.M., 2007. Intragenomic Variation and Evolution of the Internal Transcribed Spacer of the rRNA Operon in Bacteria. *Journal of Molecular Evolution* 65, 44–67.
- Storms, V., Devriese, L.A., Coopman, R., Schumann, P., Vyncke, F., Gillis, M., 2003. *Arthrobacter gandavensis* sp. nov., for strains of veterinary origin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1881–1884. doi:10.1099/ijs.0.02353-0
- Szczerba, I., 2003. Occurrence and number of bacteria from the *Micrococcus*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Kytococcus* and *Dermacoccus* genera on skin and mucous membranes in humans. *Med Dosw Mikrobiol* 55, 67–74. doi:10.1053/jhin.2000.0820
- Szewczyk, E.M., Nowak, T., Cieślowski, T., Różalska, M., 2003. Potential Role of *Staphylococcus cohnii* in a Hospital Environment. *Microbial Ecology in Health and Disease* 15, 51–56. doi:10.1080/08910600310014908
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tan, T.Y., Tan, J.S., Tay, H., Chua, G.H., Ng, L.S., Syahidah, N., 2013. Multidrug-

resistant organisms in a routine ward environment: differential propensity for environmental dissemination and implications for infection control. *J Med Microbiol* 62, 766–772.

Tattawasart, U., Maillard, J.Y., Furr, J.R., Russell, A.D., 1999. Comparative responses of *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial agents. *Journal of Applied Microbiology* 87, 323–331. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00811.x

Taubes, G., 2008. The Bacteria Fight Back. *Science* 321, 356–351. doi:10.1126/science.321.5887.356

Tena, D., Martinez-Torres, J.A., Perez-Pomata, M.T., Sáez-Nieto, J.A., Rubio, V., Bisquert, J., 2007. Cutaneous infection due to *Bacillus pumilus*: report of 3 cases. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 44, e40–e42. doi:10.1086/511077

Thomas, C.M., Nielsen, K.M., 2005. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer Between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3, 711–721.

Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2015. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews* 28, 603–661. doi:10.1128/CMR.00134-14

Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T.F., 2002. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science (New York, N.Y.)* 296, 1064–6. doi:10.1126/science.1071698

Tselenis-Kotsowilis, A.D., Koliomichalis, M.P., Papavassiliou, J.T., 1982. Acute pyelonephritis caused by *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Clinical Microbiology* 16, 593–594.

Van-Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M., 2011. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Frontiers in Microbiology* 2, 1–27.

- Vela, A.I., Gracia, E., Fernandez, A., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., 2006. Isolation of *Corynebacterium xerosis* from Animal Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 2242–2243. doi:10.1128/JCM.02473-05
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L.I., López-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernández-Soberano, C., Valencia-Cantero, E., 2013. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma* 250, 1251–1262. doi:10.1007/s00709-013-0506-y
- Veloo, A.C.M., Welling, G.W., DeJener, J.E., 2011. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe* 17, 211–212.
- Vergin, K.L., Urbach, E., Stein, J.L., DeLong, E.F., Lanoil, B.D., Giovannoni, S.J., 1998. Screening of a fosmid library of marine environmental VOL. 74, 2008 TWO PRIMERS FOR AMPLIFICATION OF BACTERIAL 16S rRNA 2469 genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order Planctomycetales. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3075–3078.
- Vermassen, A., de la Foye, A., Loux, V., Talon, R., Leroy, S., 2014. Transcriptomic analysis of *Staphylococcus xylosus* in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response to nitrosative stress. *Frontiers in Microbiology* 5, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2014.00691
- Wasi, S., Tabrez, S., Ahmad, M., 2013. Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: A review. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 8147–8155. doi:10.1007/s10661-013-3163-x
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletie, D. a, Lane, D.J., Pelletier, D. a., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703. doi:n.a.
- Weon, H.-Y., Kim, B.-Y., Hong, S.-B., Joa, J.-H., Nam, S.-S., Lee, K.H., Kwon, S.-W., 2007. *Skermanella aerolata* sp. nov., isolated from air, and emended description of the genus *Skermanella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1539–1542. doi:10.1099/ijs.0.64676-0

- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6578–6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578
- WHO, 2015. Antimicrobial Resistance [WWW Document]. World Health Organization. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> (accessed 3.22.16).
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., Strynadka, N.C., 2005. β -Lactam antibiotic resistance: A current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* 8, 525–533. doi:10.1016/j.mib.2005.08.016
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., 2011. *Prescott's Microbiology*, 8th ed. McGraw-Hill, N. Y.
- Wilson, K.H., Blichington, R.B., Greene, R.C., 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* 28, 1942–1946.
- Wimmer, J.L., Long, S.W., Cernoch, P., Land, G. a., Davis, J.R., Musser, J.M., Olsen, R.J., 2012. Strategy for Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Directly Recovered from Positive Blood Cultures Using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix System. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2452–2454. doi:10.1128/JCM.00409-12
- Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221–271. doi:10.1139/m88-093
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4576–4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576
- Wright, G.D., 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* 5, 175–186.
- Xia, J., Gao, J., Kokudo, N., Hasegawa, K., Tang, W., 2013. Methicillin-resistant

staphylococcus aureus antibiotic resistance and virulence. *BioScience Trends* 7, 113–121. doi:10.5582/bst.2013.v7.3.113

Yeh, P.J., Simon, D.M., Millar, J.A., Alexander, H.F., Franklin, D., 2011. A diversity of Antibiotic-resistant *Staphylococcus* spp. in a Public Transportation System. *Osong Public Health and Research Perspectives* 2, 202–209. doi:10.1016/j.phrp.2011.11.047

Yoon, J.-H., Oh, T.-K., 2005. *Bacillus litoralis* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1945–1948. doi:10.1099/ijs.0.63332-0

Yooseph, S., Andrews-Pfannkoch, C., Tenney, A., McQuaid, J., Williamson, S., Thiagarajan, M., Bami, D., Zeigler-Allen, L., Hoffman, J., Goll, J.B., Fadrosh, D., Glass, J., Adams, M.D., Friedman, R., Venter, J.C., 2013. A metagenomic framework for the study of airborne microbial communities. *PLoS ONE* 8. doi:10.1371/journal.pone.0081862

APÉNDICE 1

Tabla 4| Caracterización fenotípica de colonias

Cepa	Gram	Forma	Elevación	Margen	Consistencia	Morfología Colonial			
						Propiedad Óptica	Textura de Superficie	Pigmentación (color)	Tamaño mm
<i>Kocuria rosea</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP a 24 hrs, Rosa > 6días	Grande (2-3.5mm)
<i>Bacillus litoralis</i>	Variable	Irregular	Plana	Erosionado	Mucoide	Translúcida	Lisa	NP	Grande (4-7mm)
<i>Bacillus koreensis</i>	+	Circular	Plana	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP	Grande (1.5-2mm)
<i>Microbacterium oleivorans</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	anaranjado > 5días	Moderado (0.5-1mm)
<i>Micrococcus luteus</i>	+	Circular	Pulvinada	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP a 24 hrs, Amarilla > 6días	Pequeña -0.5mm
<i>Skermanella aerolata</i>	-	Fusiforme	Convexa	Entero	Húmeda	Translúcida	Lisa	Rosa	Muy variable
<i>Chryseomicrobium imtechense</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Amarillo	Moderado -1mm
<i>Planococcus plakortidis</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP a 24 hrs, Naranja > 5días	Moderado (0.5-1.5mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	+	Irregular	Plana	Rizado	Seca	Opaca	Rugosa	NP	Grande (3-10mm)
<i>Pontibacter sp.</i>	-	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Roja intensa > 6 días	Grande (1-2mm)
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	Irregular	Convexa	Ondulado	Seca	Opaca	Rugosa	Amarilla	Grande (2-5mm)
<i>Pseudomonas perfectomarina</i>	-	Irregular	Umbonada	Lobulado	Seca	Translúcida	Rugosa	NP	Grande (2-4mm)
<i>Staphylococcus sp.</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP	Moderada (1mm)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP	Pequeña <1mm
<i>Kocuria rosea</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP a 24 hrs, Rosa > 6días	Grande (2-3.5mm)
<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP 24 hrs.	Pequeña (0.5-1mm)
<i>Corynebacterium xerosis</i>	+	Fusiforme	Plana	Entero	Seca quebradiza	Opaca	Rugosa-cerosa	NP a 48 hrs, amarilla > 5días	Moderada (1mm)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Amarillo tenue a 48 hrs, amarillo int. > 5días	Pequeña (0.5-1mm)
<i>Arthrobacter gandavensis</i>	+	Circular	Elevada	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Amarillo tenue a 48 hrs, amarillo int. > 5días	Moderada (1mm)
<i>Bacillus altitudinis</i>	+	Irregular con halo	Plana	Ondulado	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP	Grande (2-4mm)
<i>Bacillus pumilus / safensis</i>	+	Semicircular	Plana	Ondulado	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP	Grande (2-4mm > 6 días)
<i>Citricoccus sp.</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Amarillo	Pequeña (0.5-1mm > 4 días)
<i>Corynebacterium xerosis</i>	+	Irregular	Plana	Erosionado	Cremosa	Opaca	Rugosa-cerosa	Amarillo	Puntiforme (<0.5mm)
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	Circular	Pulvinada	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Amarillo	Moderada (1mm)
<i>Psychrobacter faecalis</i>	-	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP	Pequeña (0.5-1.5mm)
<i>Kocuria sp.</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Amarilla > 5 días	Pequeña (0.5-1.5mm)
<i>Sanguibacter marinus</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Amarilla > 5 días	Moderada (1-1.5mm)
<i>Kocuria aegyptia</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP a 48 hrs, anaranjada > 5 días	Moderada (1mm)
<i>Micrococcus luteus</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Amarilla > 5 días	Moderada (1mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	NP	Pequeña -0.5mm
<i>Agrococcus lahaulensis</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Amarillo	Pequeña -0.5mm
<i>Arthrobacter agilis</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Translúcida	Lisa	Rojo intenso	Moderado (0.5-1mm)
<i>Planomicrobium chinense</i>	+	Circular	Convexa	Entero	Cremosa	Trasparente	Lisa	NP a 48 hrs, Anaranjado >15 días	Moderado (0.5-1mm)
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	+	Circular	Umbonada	Ondulado	Cremosa	Translúcida	Lisa	Anaranjado tenue	Grande (1.5-5mm)
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	Irregular con Halo	Convexa	Entero	Mucoide	Transparente	Lisa	Amarillo tenue	Moderado -1mm

APÉNDICE 2

Niveles de bioseguridad en laboratorios microbiológicos (OMS, 2005)

Los laboratorios microbiológicos representan áreas de análisis especiales que, a menudo, representan riesgos en la transmisión de enfermedades infecciosas para sus ocupantes.

Los niveles de bioseguridad constan de técnicas y prácticas combinadas de laboratorio, equipos de seguridad e infraestructura del laboratorio. El nivel de bioseguridad 1, es un nivel básico de contención basado en análisis microbianos estándar sin barreras primarias o secundarias, en los cuales se trabaja con cepas definidas no patógenas. El nivel de bioseguridad 2, es aquel en el que las prácticas, los quipos y el diseño son adecuados para laboratorios educativos, de diagnóstico, clínicos, u otros donde se analicen un amplio espectro de agentes de riesgo moderado.

El nivel de bioseguridad 3, es aquel donde las prácticas, quipos de seguridad y diseño son aplicables a laboratorios clínicos, de investigación, educación o diagnóstico, donde se analizan agentes exóticos o indígenas con capacidad de transmisión respiratoria. Y el nivel de bioseguridad 4, es aquel donde el análisis microbiano corresponde con agentes peligrosos o tóxicos que ponen en riesgo la vida, cuya transmisión es por medio de aerosoles y para los cuales no existen vacunas o terapias disponibles.