



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**Aislamiento e identificación de bacterias Aero-
transportadas en tres sitios del Valle de Toluca, Estado
de México**

QUE PRESENTA

Arturo Martínez Santiago
(2123058624)

ASESORES:

María Teresa Núñez Cardona (14473)

Samuel González García (40142)

Ciudad de México, 22 de Enero de 2020

I. AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Teresa Núñez Cardona, por aceptarme en su gran equipo de trabajo, por ser y enseñarme como ser una excelente persona, agradezco todas las enseñanzas que me dio, por sus amplios consejos tanto en lo personal y profesional y por su motivación de enseñanza hacia todos sus alumnos.

Al Mtro. Samuel González García por aceptarme como su alumno y por lo aprendido en las pruebas moleculares.

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez y Dra. Aída Hamdan Partida, por permitirme realizar parte del trabajo que se realizó durante este servicio social, por su amabilidad y atención que recibí durante la estancia con ellos.

Dr. Raúl V. Díaz Godoy, por su amable atención durante los muestreos, por su amabilidad y humildad, por hacernos parte de su equipo de trabajo y por ser un amigo con el que puedo confiar.

Al biólogo Erick Uriel Quezada Cabrera, gracias por tu sincera amistad que me brindaste y has brindado, gracias por tu apoyo en el laboratorio y por ser un hermano para mí.

A las futuras biólogas Esmeralda Jaimes y Paola Morales, porque con ustedes el trabajo fue más grato y por acompañarme en este servicio social y por brindarme su amistad.

A la Lic. en QFB Erika Gómez por su gran apoyo en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, por todo lo enseñado muchas gracias. A Normita (laboratorista de este laboratorio) gracias por su amabilidad.

A la RAMAT por permitirnos hacer los muestreos en sus instalaciones y al CONACYT por financiar el proyecto 34311922 y por otorgarme la beca 27885.

A todo el gran equipo del Laboratorio de Ecología Microbiana en especial a la Dra. María de Jesús Ferrara, Dr. Roberto Ángeles, al M. en C. Alfonso Esquivel y a la Mtra Ruth Soto por su amabilidad y amplios consejos.

A la familia Quezada Cabrera por brindarme su amistad.

II. DEDICATORIA

Dedicado a mi papá Abraham Martínez y a mi mamá Marciana Santiago, por apoyarme todos estos años, por brindarme su cariño y amor para siempre salir adelante, por darme más de lo que necesitaba, estaré eternamente agradecido con la vida por darme unos padres perfectos, son mi ejemplo a seguir los amo muchísimo.

A mis hermanas Perla Carina y Anayeli por apoyarme siempre, sin duda tenemos a unos grandes padres que nos enseñaron a luchar por lo que más nos gusta, gracias por el apoyo brindado durante este tiempo, la vida no me alcanzaría para alcanzar a agradecerles.

III. RESUMEN

Las bacterias son uno de los muchos tipos de partículas de aerosol biogénico que se encuentran en todas partes de la atmósfera debido a su tamaño, las bacterias tienen un largo tiempo de resistencia en la atmósfera y pueden ser transportadas por el viento en largas distancias. El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo Cuantificar, aislar y caracterizar bacterias heterótrofas aerotrasportadas, provenientes de tres estaciones de muestreo, de la Red Automática de Monitoreo Ambiental, en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca, Estado de México. las muestras fueron colectadas por la técnica por impactación directa, que consistió en dejar abiertas, durante 30 minutos, cajas Petri, conteniendo agar nutritivo (no selectivo), los cultivos fueron incubados a 28 °C durante 24 h, pasado el tiempo se cuantificaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se realizaron aislamientos y tinción de Gram, para la obtención de cultivos puros y se registro la morfología celular; se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas convencionales y la capacidad de producir enzimas extracelulares. Los resultados se anotaron y fueron pasados a Systat, se eligieron los cultivos que fueron sometidos a la susceptibilidad de los cultivos bacterianos a los antibióticos y a la extracción del gen 16S rRNA. El sitio con más UFC fue San Mateo y la morfología en general predomino los bacilos esporulados, el sustrato más utilizado fue la destrosa y la enzima extracelular más producida fue la gelatinasa. De los 29 cultivos seleccionados, fueron identificados 13 especies diferentes, siete pertenecientes al género *Bacillus*, tres a *Kokuria*, dos a *Staphylococcus* y una a *Exiguobacterium*. La mayoría de las especies encontradas son resistentes a AMC, P, AMX, SXT, CFM, CF y CR. Las especies reportadas se conoce que solo algunas son de interés medica pues pueden poner en riesgo la salud de la población; pero de algunas son de gran utilidad en la biorremediación de ambientes o bien, son utilizadas como promotoras de crecimiento vegetal.

Palabras clave: Bacterias del aire, RAMAT, Caracterización fisiológica, Identificación genómica, Susceptibilidad antibiótica

INDICE

I.	AGRADECIMIENTOS	2
II.	DEDICATORIA	4
III.	RESUMEN	5
1.	Introducción	7
2	Revisión de literatura.....	9
3	Objetivo General.....	12
3.1	Objetivos Particulares.....	12
4	Metodología.....	13
4.1.	Área de estudio.....	13
4.2.	Colecta de muestras y conservación de cultivos	13
4.2	Obtención y conservación de cultivos puros	14
4.3	Pruebas bioquímicas aplicadas a cultivos bacterianos puros	15
4.4	Selección de cultivos bacterianos puros para la extracción de DNA y pruebas de susceptibilidad	15
4.5	Extracción del DNA genómico de bacterias a cultivos puros	16
4.5.1	Electroforesis en gel de agarosa.....	17
4.5.2	Amplificación del gen 16s rRNA por PCR punto final.....	17
4.6	Susceptibilidad de los cultivos bacterianos puros a 14 antibióticos	19
5	Resultados.....	20
5.1	Morfología colonial.....	20
5.2	Utilización de sustratos orgánicos como única fuente de carbono y energía	21
5.3	Metabolismo respiratorio	23
5.4	Producción de enzimas extracelulares	24
5.5	Selección de cultivos para las pruebas de sensibilidad y extracción de ADN	25
5.6	Susceptibilidad bacteriana con los antibióticos ensayados.....	27
5.7	Extracción de ADN bacteriano	29
6	Discusión	36
7	CONCLUSIONES.....	44
8	Referencias	45

1. Introducción

La atmósfera es una mezcla de gases y pequeñas partículas líquidas y sólidas, dentro de sus principales componentes están el oxígeno (O_2) y el nitrógeno (N_2); además, en el aire, se encuentran cantidades variables de agua (H_2O en forma de humedad) según su distribución geográfica y época del año (Jiménez, 2001).

Actualmente los problemas de la contaminación ambiental, en particular los del aire, ponen en riesgo e inclusive comprometen la salud humana, la de otros organismos vivos y de los ambientes naturales. Gran parte de estos problemas han sido consecuencia del rápido crecimiento urbano y de la industrialización, fenómenos que muchas veces no van de la mano con programas para proteger al ambiente (Lacasaña et al., 1999).

La contaminación del aire no es un problema exclusivo de algunas regiones, países o ciudades, este puede afectar a una gran proporción de la población mundial (Briones et al., 2016). Dicha contaminación se debe a elementos exógenos que contaminan y alteran su composición y que afectan a cualquier componente de los ecosistemas. Desde el punto de vista antropocéntrico la contaminación atmosférica se refiere a aquellos elementos o compuestos que afectan a la salud o bienestar de los humanos (Oyarzún, 2010).

La contaminación ha adquirido tal magnitud que, a nivel mundial, es uno de los grandes problemas; esto ha obligado a las sociedades a tomar medidas para prevenir y disminuir los agentes contaminantes ya que en las últimas décadas se reportan evidencias sobre la asociación entre los contaminantes atmosféricos y el incremento de las consultas de urgencia por enfermedades respiratorias (Jiménez, 2001).

Las principales vías de exposición a dicha contaminación son por inhalación, ingestión y contacto con la piel; la primera es la que da lugar a los mayores problemas para la salud. Las partículas más perjudiciales son las de tamaños

inferiores a 5 μm , ya que pueden ser inhalados fácilmente y alcanzar los alveolos pulmonares, donde pueden depositarse y causar infecciones o reacciones alérgicas (Stetzenbach, 2002 citado en Martínez, 2013).

Las bacterias son uno de los muchos tipos de partículas de aerosol biogénico que se encuentran en todas partes de la atmósfera debido a su tamaño, las bacterias tienen un largo tiempo de resistencia en la atmósfera y pueden ser transportadas por el viento en largas distancias (Bauer et al., 2002; Elbert et al., 2007). Pueden eliminarse por precipitación o deposición sobre las superficies (Burrows et al., 2009)

En México, el Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México (SIMAT) ha manifestado que la contaminación del aire proviene de la adición de sustancias emitidas a la atmósfera que le causan un desequilibrio en su composición original. El aire contaminado contiene microorganismos, gases, polvos, olores y humos en grandes cantidades que pueden dañar la salud de humanos y otros seres vivos.

En el aspecto económico, la contaminación atmosférica es también un tema de relevancia, estimaciones de su efecto indican que el impacto de la contaminación del aire sobre la productividad económica de México asciende a más de 5000 millones de pesos. Aunado a eso, los gastos derivados de consultas y hospitales se estiman por encima de los 640 millones de pesos por lo que, el costo anual de la contaminación atmosférica es de más de 5600 millones de pesos (IMCO, 2014).

Dentro de las principales fuentes de generación de contaminantes en el aire que pueden provocar alteraciones a la salud humana y su entorno están el monóxido de carbono, material particulado (PM10), hidrocarburos aromáticos policíclicos, dióxido de azufre(SO₂) y ozono(O₃) que se encuentra a nivel del suelo (Venegas, 2010); además son habituales agentes bacterianos y, entre los más frecuentes están: bacilos pleomórficos Gram positivos (*Corynebacterium*) y los cocos Gram positivos a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*, los bacilos Gram negativos como los pertenecientes a (*Flavobacterium*, *Alcaligenes*) aunque estos últimos se encuentran en menor proporción (De la Rosa et al., 2002)

Comparando con lo que se investiga en el mundo, en México son muy pocas las investigaciones relacionadas a los componentes bacterianos presentes en el aire y a sus efectos en la salud humana, por ello en esta investigación pretende contribuir al conocimiento de la composición bacteriana presente en el aire del Valle de Toluca y con ello determinar si podrían representar riesgo para la salud humana y ambiental.

2 Revisión de literatura

Los bioaerosoles son partículas de tamaño microscópico suspendidas en el aire, bien de origen biológico o que puedan afectar a los seres humanos causándoles algún tipo de alergia, toxicidad o infección. Estos pueden estar constituidos por virus, bacterias, esporas, polen y en general cualquier resto de organismos con un diámetro aerodinámico comprendido entre 0.5 y 100 μm (Cox y Wathes, 1995 citado en Maldonado-Vega et al., 2014).

La característica más relevante de los bioaerosoles es el comportamiento aerodinámico que presentan estas partículas cuando son emitidas al aire. Una vez que se encuentran en suspensión, su comportamiento aerodinámico va a estar gobernado por sus propiedades físicas (forma, tamaño y densidad) y las condiciones ambientales (corrientes de aire, humedad y temperatura) (Sánchez-Monedero et al., 2006).

La velocidad de sedimentación teórica de las partículas con tamaños entre 0.1 y 1 μm es aproximadamente de 0.01 cm s^{-1} , lo que supone que estas necesitarían más de cinco horas antes de alcanzar al suelo desde una altura de dos metros. Estas condiciones ideales no se pueden extrapolar cuando las partículas se encuentran a distintas condiciones ambientales, donde factores tales como turbulencias atmosféricas, temperatura y humedad, pueden aumentar la velocidad de sedimentación hasta 1 cm s^{-1} . Incluso en estos casos, los bioaerosoles podrían permanecer suspendidos en el aire durante varios minutos antes de ser depositados en el suelo o en cualquier otra superficie. Durante el tiempo que

permanecen suspendidas en el aire, las partículas podrían ser transportadas por la acción del viento a distancias que pueden variar desde unos pocos metros hasta varios kilómetros (Sánchez-Monedero et al., 2006).

Las bacterias ingresan a la atmósfera como partículas de aerosol de prácticamente todas las superficies, incluyendo el suelo, agua y las superficies de las plantas (Jones y Harrison, 2004). La vida en la atmósfera se caracteriza por la escasez de nutrientes y sustratos, radiación UV, desecación, cambios de temperatura y pH, Womack et al., (2010) asegura que la sobrevivencia de las bacterias en el aire probablemente se deriva de, entre otros, mecanismos de reparación de ADN y pigmentación, los cuales promueven adaptaciones metabólicas a la escasez de nutrientes.

Un estudio realizado por Herrera et al. (2012) corroboró que la influencia de factores ambientales como la humedad relativa, la temperatura y la precipitación son importantes, además, reveló que los valores más altos de bacterias y hongos se da en las primeras horas de la mañana. En este estudio encontraron 40 géneros bacterianos, predominando *Staphylococcus* del cual, identificaron 10 especies y de los que sobresale *S. aureus*; la importancia de la presencia de esta en el ambiente radica en su patogenicidad, que va desde infecciones menores de la piel y abscesos cutáneos hasta enfermedades que pueden poner en riesgo la vida como neumonía, meningitis y síndrome de shock tóxico, además de esta especie predominaron las bacterias Gram positivas.

Méndez-Puentes et al. (2015) en dos épocas del año, una en sequía (junio) y la segunda en época de lluvias (noviembre) en Neiva Colombia, observaron que la temperatura y la humedad relativa fueron factores ambientales determinantes para el crecimiento de los microorganismos en el aire, especialmente para las detectadas en la época de sequía. De las bacterias aisladas los bacilos Gram positivos no esporulados fueron los más frecuentes. También reportaron la presencia de bacilos Gram positivos esporulados y de bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa, poco comunes en el aire. Los bacilos Gram positivos no

esporulados aislados en esta investigación se relacionan con patologías como amigdalitis, faringitis, neumonía entre otras, con respecto a las bacterias Gram positivas estas se han encontrado en la piel y en las mucosas de los organismos por lo que suelen ser transportadas por actividades comunes del hombre y por el polvo que se encuentra suspendido en el suelo. La presencia en el aire de los bacilos Gram positivos enporulados se debe al desarrollo de esporas que les confiere resistencia a las condiciones ambientales extremas y les permite sobrevivir más tiempo en el ambiente.

Jacob et al. (2015) en su estudio realizado en noviembre del 2013 muestran un crecimiento de UFC de 2055 por m³, logrando identificar once especies diferentes de bacterias, todas aerobias, Gram positivas y bacterias formadoras de endosporas, las especies identificadas están *Bacillus cereus*, *B. aerius*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *B. axarquiensis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. methylotrophicus*, *Bhargavae acecembensis* y *Cellulomonas* sp. En relación a las enfermedades pulmonares más frecuentes en la zona estudiada fueron bronquitis, infección de tórax, neumonía y enfermedades pulmonares.

Smets et al. (2014) en un estudio realizado en Bélgica, encontró que las bacterias que son pigmentadas resisten más a la radiación UV, y encontraron que las bacterias del aire se adaptan a los contaminantes presentes en este, por ello las bacterias suspendidas podrían servir para aplicaciones en biomonitoreo y biorremediación.

Wu et al. (2012) en su estudio realizado en la ciudad de Shin Jhuang, Taiwán, obtuvieron un promedio de 1986 UFC/m³, donde predominaron los bacilos Gram negativos y los cocos, sus análisis revelaron que la velocidad y dirección del viento influyeron significativamente en la distribución bacteriana del ambiente, además que la temperatura y la humedad relativa también fueron factores ambientales importantes asociados positivamente con las concentraciones bacterianas ambientales.

Un estudio realizado en la Ciudad Juárez, Chihuahua, tuvo como finalidad determinar la relación entre consultas por enfermedades respiratorias y la contaminación atmosférica, considerando además parámetros meteorológicos como temperatura, humedad relativa y velocidad del viento. Observaron que a medida que incrementó la concentración de PM10 (en un promedio de 24 horas), aumentó el número de consultas por asma en un 4.9% y en un 2.9% en salas de urgencias por infecciones respiratorias agudas (Hernández-Cadena et al., 2000).

Otro estudio realizado en México, tuvo como finalidad determinar la concentración y tipo de microorganismos cultivables suspendidos en la atmósfera de la ciudad de Monterrey, donde se tuvo en cuenta la intensidad de la actividad humana, el tráfico vehicular, la dirección del viento, la humedad relativa y la temperatura a dos horas diferentes del día. Durante esta investigación se realizaron conteos microbianos de bacterias mesofílicas aerobias, sus resultados mostraron que se aislaron, coliformes, hongos, cocos Gram positivos como *Staphylococcus aureus* y un bacilo Gram negativo la *Pseudomona aeruginosa*. Concluyeron que *Bacillus* fue el más frecuente e identificaron especies patógenas oportunistas de este género tales como *B. cereus*, *B. licheniformes*, *B. coagulans* y *B. subtilis*.

3 Objetivo General

Cuantificar, aislar y caracterizar bacterias heterótrofas aerotrasportadas, provenientes de tres estaciones de muestreo, de la Red Automática de Monitoreo Ambiental, en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca, Estado de México.

3.1 Objetivos Particulares

- Cuantificar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), de bacterias heterótrofas aerotrasportadas, de las tres estaciones de muestreo de la RAMA-ZMVT.
- Obtener cultivos bacterianos puros y caracterizarlos mediante su capacidad catabólica, producción de enzimas extracelulares y su metabolismo respiratorio.

- Identificar molecularmente a las bacterias heterótrofas aerotransportadas aisladas en tres estaciones de muestreo de la RAMA-ZMVT.
- Determinar factores de patogenicidad, en bacterias heterótrofas aerotransportadas, de las tres estaciones en la RAMA-ZMVT.

4 Metodología

4.1. Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento del Hombre y su ambiente y en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Departamento de Atención a la Salud, ambos laboratorios pertenecientes a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Así mismo se recolectaron muestras bacterianas del aire en tres estaciones pertenecientes a la Red Automática de Monitoreo Ambiental (RAMA) de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT).

4.2. Colecta de muestras y conservación de cultivos

Como parte del equipo de trabajo de la Doctora María Teresa Núñez Cardona, fueron colectados en enero de 2018 componentes bacterianos en las estaciones de San Cristóbal (SC), San Mateo (SM) y Oxtotitlán (OX) pertenecientes a la RAMAT (figura 1); para ello se utilizó la técnica por impactación directa, que consistió en dejar abiertas, durante 30 minutos, cajas Petri, conteniendo agar nutritivo (no selectivo). Los cultivos fueron trasladados a la UAM-X para su incubación en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la UAM-X, donde fueron expuestas a 28 °C.



Figura 1. Sitios de muestreo de la Zona Metropolitana del Valle de México (San Cristóbal, San Mateo y Oxtotitlán). Tomado de Google earth, 2019.

Pasado el tiempo de incubación y al observar el crecimiento de las colonias bacterianas, se cuantificaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC); tras realizar aislamientos al azar, las colonias bacterianas seleccionadas fueron resembradas en viales conteniendo agar nutritivo seguido de incubarlas a 28°C durante 24 horas. Los cultivos crecidos fueron conservados a 4 °C para su procesamiento posterior.

A partir de esta fase es como se inició el presente proyecto de investigación que comprendió los aspectos que se describen a continuación.

4.2 Obtención y conservación de cultivos puros

Se obtuvieron cultivos puros a partir de cultivos mixtos originales que fueron conservados en los viales. Para ello, las bacterias fueron suspendidas en caldo nutritivo e incubados a 28 °C durante 20-30 minutos que favoreció su crecimiento, pasado el tiempo de incubación, las bacterias suspendidas fueron estriadas en agar nutritivo para contar con colonias separadas y facilitar su aislamiento. Se aplicó la técnica de siembra y resiembra hasta contar con cultivos puros, para ello, cada colonia aislada fue inoculada en agar nutritivo (cajas divididas en ocho, en cada espacio una colonia seleccionada). A cada cultivo crecido se le realizó la

tinción de Gram y se hicieron observaciones en microscopio óptico, lo cual permitió conocer su morfología microscópica, su uniespecificidad además de su respuesta a esta tinción. Una vez que se verificó la uniespecificidad de los cultivos, estos fueron resembrados en viales de 6 ml conteniendo agar nutritivo inclinado y se conservaron a 4 °C.

4.3 Pruebas bioquímicas aplicadas a cultivos bacterianos puros

Se realizaron pruebas bioquímicas convencionales para la caracterización de los cultivos bacterianos puros las cuales se describen a continuación:

- En base rojo de fenol se determinó la capacidad de utilizar sustratos orgánicos como única fuente de carbono y energía que incluye: glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, dextrosa, además del citrato para este último se utilizó el medio citrato de Simmons. Para analizar los resultados se aplicó el Índice Medio de Utilización de sustratos (IMU) (Carballo, 1985).
- Metabolismo respiratorio (Oxido-fermentación en glucosa y fructosa) en medios semisólidos con base rojo de fenol y agar bacteriológico.
- En medio SIM se observó la producción de H₂S, movilidad e indol.
- Reducción de nitratos y nitritos.
- Capacidad de producir enzimas extracelulares como amilasa, gelatinasa, ADNasa, ureasa y lipasa.
- Actividad hemolítica

4.4 Selección de cultivos bacterianos puros para la extracción de DNA y pruebas de susceptibilidad

Se seleccionaron cultivos bacterianos puros para la realización de extracción de DNA y pruebas de susceptibilidad, para ello, se generaron tres dendogramas (uno por sitio muestreado) utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard con el paquete estadístico SYSTAT 13.1m. Para ello se elaboró una base de datos binarios en donde 1 es positivo (presencia) y 0 negativo (ausencia) considerando las características morfológicas celulares de los cultivos bacterianos, su respuesta

a la tinción de Gram, las pruebas bioquímicas, su capacidad de producir enzimas extracelulares y de hemólisis.

4.5 Extracción del DNA genómico de bacterias a cultivos puros

Con base en el análisis de similitud antes expuesto, fueron seleccionados los cultivos bacterianos para su identificación de acuerdo a sus características morfológicas, pruebas bioquímicas, producción de enzimas extracelulares y capacidad hemolítica.

Para la extracción del DNA de las bacterias, se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification de la marca Promega y se siguió las indicaciones del fabricante como se describe a continuación.

Se adicionó 1 mL de cultivo (crecido en caldo nutritivo durante 24 horas) a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 minutos, se decantó el sobrenadante y posteriormente se suspendieron las células en 480 µL de EDTA (Ácido etilendiamintetracético) (50mM) y se mezcló hasta disolver. Se adiciono 60 µL de la enzima lisozima y 60 µL de SDS (Dodecilsulfato de sodio) al 20%, se mezcló e incubó a 37 °C durante 60 minutos, transcurrido el tiempo se centrifugo 2 minutos a 13 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 600 µL de la solución de lisis nuclear y se mezcló hasta resuspender las células. Se incubo en baño maría por 5 minutos a 80 °C y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 3 µL de solución RNAsa, se mezcló y se incubo por 30 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo se adicionaron 200 µL de solución de precipitación de proteínas, se mezcló e incubó por 5 minutos en hielo. Se centrifugo durante 3 minutos a 13 000 rpm.

En otro tubo de microcentrifuga de 1.5 mL se agregaron 600 µL de isopropanol, se vació el sobrenadante y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces hasta observar una masa visible de DNA. Se centrifugo por 2 minutos a 13 000 rpm y se decantó el sobrenadante, se agregaron 600 µL de alcohol etílico al 70% y se mezcló varias veces hasta que el pellet de DNA se mezclara. Se centrifugo por 2 minutos a 13

000 rpm y se decantó el sobrenadante, secando el tubo con papel absorbente cuidadosamente. Se dejó secar el DNA durante 10-15 minutos en campana de flujo laminar, posteriormente se adiciono 100 μ L de solución de rehidratación de DNA, el tubo fue conservado en congelación.

4.5.1 Electroforesis en gel de agarosa

Se comprobó la extracción de DNA bacteriano por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para su preparación del gel, se adiciono 30 mL de solución buffer TBE (Tris borato EDTA, pH 8.3) al 0.5X y 0.3 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer, se calentó hasta su ebullición y posteriormente se vertió la solución en un soporte para preparar gel, se dejó solidificar y posteriormente se colocó el gel en una cámara de electroforesis. En cada pozo se colocó la mezcla de 1 μ L de buffer de carga y 5 μ L de la muestra, se verificó que el gel estuviera cubierto con TBE AL 0.5X en la cámara y se corrió a 60 V durante 40 minutos, pasado este tiempo, el gel se tiño en solución de bromuro de etidio durante 15 minutos. Pasado el tiempo, el proceso y la pureza de extracción de DNA se comprobó tras visualizar la presencia de ADN en un transluminador de luz ultravioleta marca Bio-Rad.

4.5.2 Amplificación del gen 16s rRNA por PCR punto final

Una vez visualizado el DNA extraído se preparó la mezcla de reacción (tabla 1) para realizar la PCR. El volumen de los reactivos se calculó de acuerdo al número de muestras que se procesaron. El volumen total de los reactivos fueron incorporados en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, sin adicionar el 1 μ L de DNA. La muestra se centrifugo para homogeneizar y se vació 19 μ L de esta en cada tubo para PCR (200 μ L) y se agregó el 1 μ L de ADN.

Tabla 1. Reactivos para una reacción de PCR

Reactivos	Volumen (μ L)
PCR Master mix, 2X	10
Primer Forward (8)	0.5
Primer Reverse (1492)	0.5

DNA	1
H2O	8
Total	20

Posteriormente se colocaron los tubos de PCR en un termociclador marca TECHNE TC-300 y se realizó la corrida de PCR bajo las siguientes condiciones tabla 2 de tiempo y temperatura, con un total de 35 ciclos a partir del segundo-cuarto proceso. Al terminar la PCR, los amplificados se almacenaron a 4 °C.

Tabla 2. Condiciones del termociclador para la reacción de PCR del gen 16S ARNr

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos
Desnaturalización	94 °C	30 segundos
Alineamiento	52 °C	30 segundos
Extensión	72 °C	40 segundos
Extensión final	72 °C	7 minutos

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar el producto obtenido de PCR. Se depositó en cada carril la mezcla de 1 µL de 5X Green Go Taq flexi buffer y 5 µL de producto de PCR, se corrió a 60 V durante 40 minutos. El gel se tiñó en solución de bromuro de etidio durante 15 minutos y se reveló en un transluminador de luz ultravioleta marca Bio-Rad esperando un amplicon de 110 pb.

Una vez comprobada la amplificación del gen 16S rRNA se realizó la purificación de los productos con el Kit comercial ExoSAP, en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL se añadió 5 µL del producto de PCR y se le añadió 1 µL de exonucleasa I y 1 µL de fosfatasa alcalina se incubó a 37 °C durante 15 minutos y se incubó en baño maría a 80 °C durante 15 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y fueron conservados en refrigeración.

Los productos de PCR purificados se enviaron a secuenciar a MacroGen-Corea. Una vez obtenidas las secuencias, fueron comparadas con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para su identificación de cada uno de los cultivos bacterianos. Los datos obtenidos en el análisis de las secuencias se complementaron con las características fisiológicas previamente realizadas.

4.6 Susceptibilidad de los cultivos bacterianos puros a 14 antibióticos

Para la prueba de susceptibilidad a antibióticos para Gram positivos y Gram negativos, la prueba consistió en inocular con 1.0 mL de cultivo puro de manera individual (previamente crecido durante una hora en caldo nutritivo) una caja de Petri conteniendo agar de Mueller-Hinton, una vez inoculadas en las cajas Petri se les colocó un sensidisco con los 14 antibióticos (ACCUATRACK) considerando su respuesta a la tinción de Gram y se incubaron a 28 °C durante 16-18 horas, después de este tiempo se hicieron las lecturas tomando como base las recomendaciones Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017). Se observó la presencia o no de un halo de inhibición de crecimiento bacteriano. Dependiendo del diámetro (cm) del halo fueron considerados como resistentes, intermedios y sensibles.

Los antibióticos ensayados para cultivos Gram positivos y negativos fueron los siguientes:

Bacterias Gram positivas (marca Accutrac), los sensidiscos incluyeron: Penicilina (PG/P/10 µg), Amoxicilina/ácido clavulánico (AX/20/10 µg), Eritromicina (ER/EM/15 µg), Amoxicilina (AX/AMX/10 µg), Cotrimoxazol (CT/SXT/25 µg), Cefalexina (CP7CFM/30 µg), Cefazolin (CF/CFZ/30 µg), Cefuroxima (CR/XM/30 µg), Cloranfenicol (CK/C/30 µg), Ciproflaxacina (CI/5 µg), Ofloxacina (OF/5 µg), Piperacilina (CP/PI/100 µg), Azitromicina (AZ/15 µg) y Tetraciclina (TE/30 µg).

Bacterias Gram negativas (marca Accutrac) los sensidiscos incluyeron: Cefuroxima (CR/XM/30 µg), Norfloxacina (NF/NOR/10 µg), Aztreonam (AT/30 µg), Cefotaxima (CX/CTX/30 µg), Ceftriaxona (FR/CRO/30 µg), Ácido Nalidíxico (NA/30

μg), Nitrofurantoina (FU/NI/300 μg), Gentamicina (GM/10 μg), Amikacina (AK/30 μg), Ciprofloxacino (CI/5 μg), Ofloxaina (OF/5 μg) Ceftazidima (CZ/CAZ/30 μg), Cefixima (FX/FIX/5 μg) y Cefdinir (CN/CD/ 5 μg).

5 Resultados

Las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de los tres sitios de muestreo en medio de agar nutritivo, se presenta en la tabla 3 en la cual se puede observar que en SM se registró el con mayor número de UFC y en OX el menor número

Tabla 3. UFC cuantificadas en agar nutritivo en las tres estaciones de muestreo.

Sitio	Medio	No. UFC
San Cristóbal (SC)	Agar nutritivo	74
San Mateo (SM)	Agar nutritivo	103
Oxtotitlán (OX)	Agar nutritivo	52

5.1 Morfología colonial

Se obtuvieron 75 cultivos puros, 29 pertenecen a San Cristóbal, 24 a San Mateo y 22 a Oxtotitlán. El 63% presentó la forma bacilar y el 37% en forma de cocos, el 99% presentó una respuesta positiva a la tinción de Gram (bacilos y cocos), y solo en el 1% (cocos) la respuesta fue negativa.

La forma bacilar domino en San Cristóbal y San Mateo, y en Oxtotitlán la mitad de cultivos fueron de forma bacilar y la otra mitad fue esférica (figura 2).

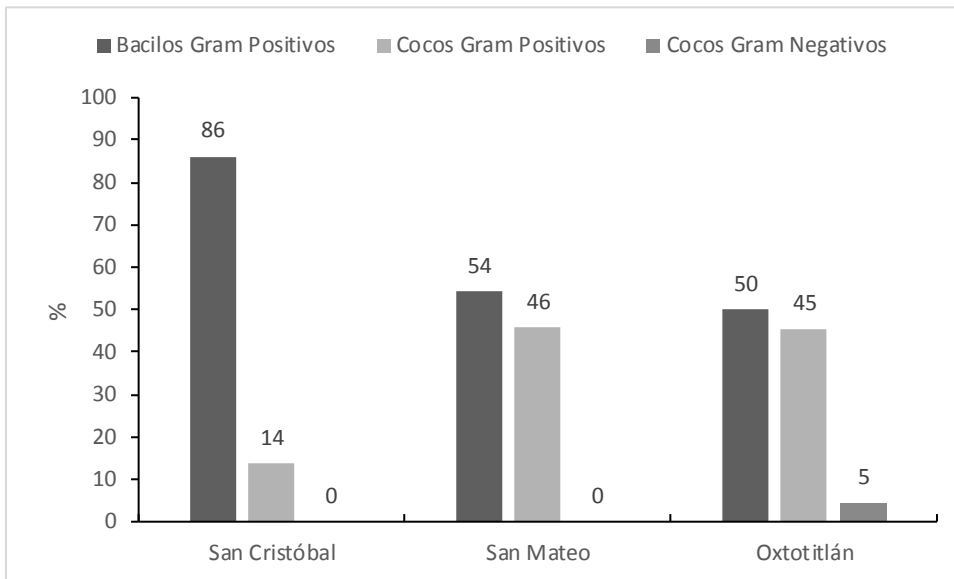


Figura 2. Morfología celular y respuesta a la tinción de Gram de las bacterias aisladas de los tres sitios de muestreo.

5.2 Utilización de sustratos orgánicos como única fuente de carbono y energía

Como se muestra en la figura 3, los cultivos bacterianos utilizaron dextrosa, seguido de la sacarosa, maltosa, manitol y fructosa; las menos asimiladas fueron el citrato y la lactosa.

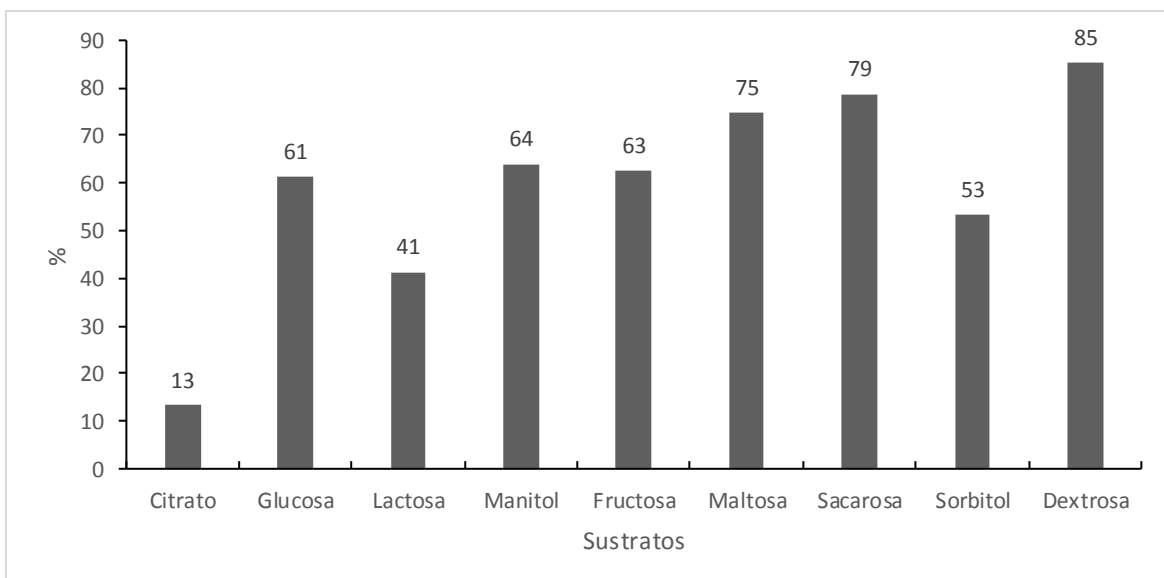


Figura 3. Utilización de sustratos, como únicas fuentes de carbono y energía por los 75 cultivos aislados.

El Índice Medio de Utilización de los sustratos, revelo que los valores en San Cristóbal y San Mateo son muy parecidos, el primero fue de 66% y el segundo 61%; en tanto que en Oxtotitlán este fue menor (figura 4).

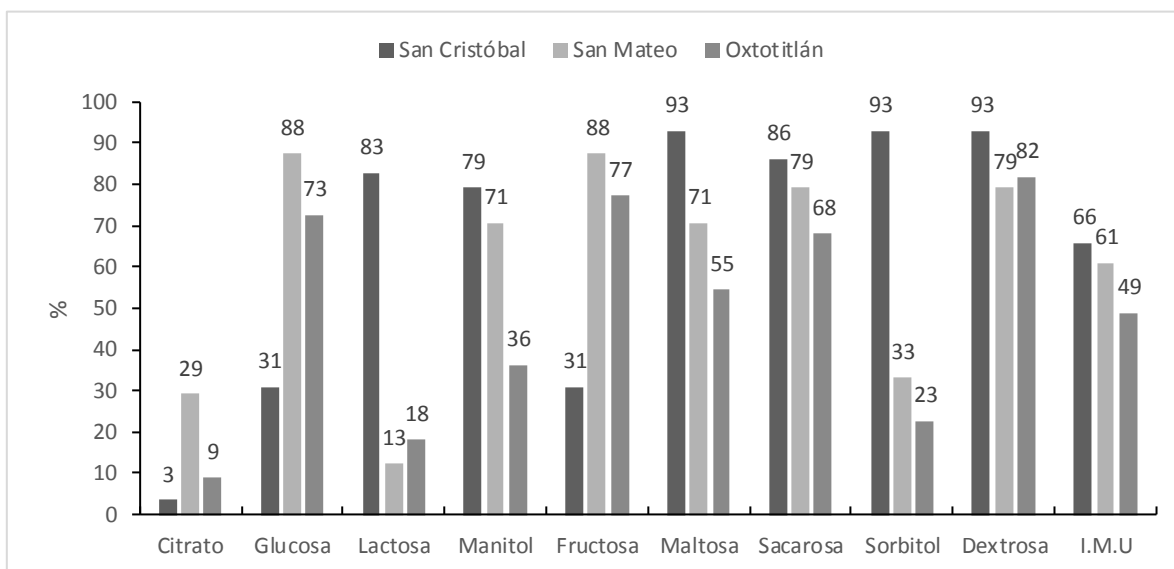


Figura 4. Porcentaje de asimilación de los sustratos por sitio.

En la figura 5 se presenta el número de cultivos capaces de crecer en condiciones aerobias y anaerobias en fructuosa y glucosa. Como puede observarse, la mayoría de los cultivos de San Cristóbal son aerobias estrictos en tanto que los de San Mateo y Oxtotitlán son capaces de crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias, esto es que son anaerobios facultativos.

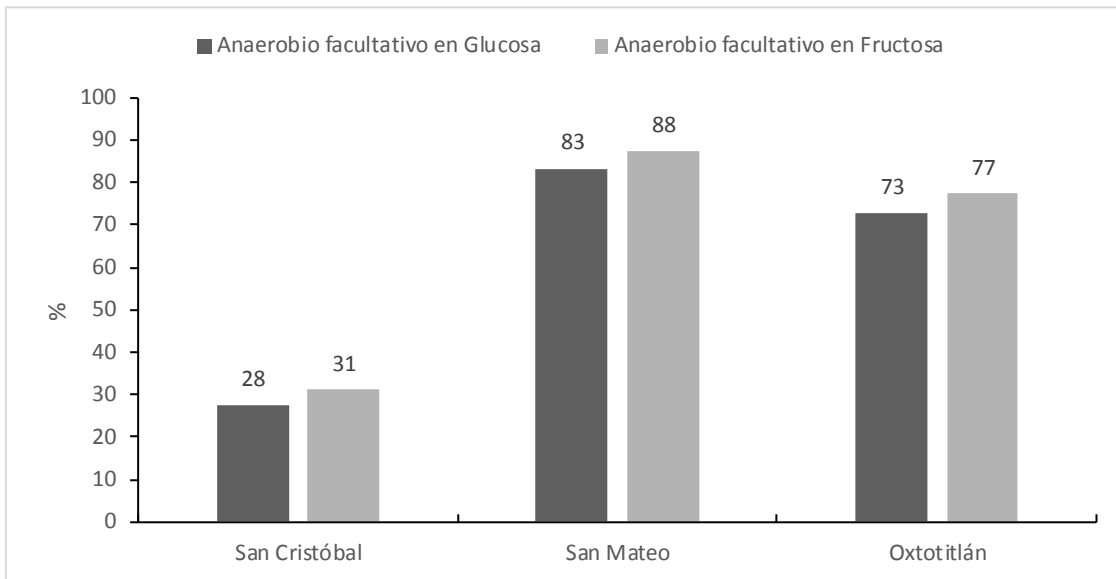


Figura 5. Porcentaje de cultivos aislados anaerobios facultativos por cada sitio

5.3 Metabolismo respiratorio

En la figura 6 se desglosan los porcentajes de las actividades anaeróbicas y fermentadoras de los cultivos por muestra. Los cultivos aislados de San Mateo tuvieron un mayor porcentaje de actividad anaeróbica facultativa en ambos sustratos, le sigue Oxtotitlán y por ultimo San Cristóbal. Aunque en las tres estaciones muestreadas donde se obtuvo mayor actividad anaeróbica fue en fructosa a comparación de glucosa.

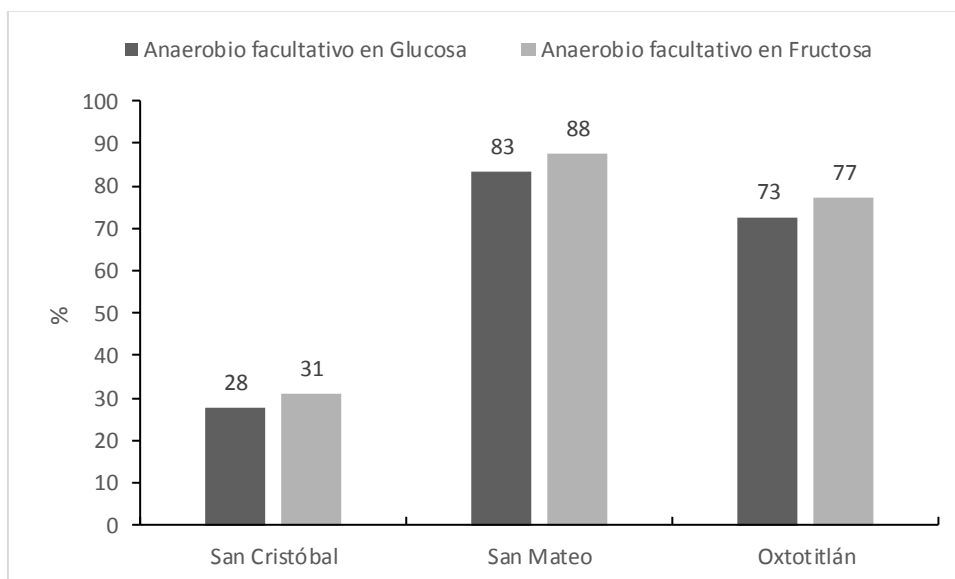


Figura 6. Porcentaje de cultivos anaerobios facultativos de los tres sitios de muestreo.

5.4 Producción de enzimas extracelulares

Los resultados de los 75 cultivos con capacidad de producir enzimas extracelulares y capacidad hemolítica mostraron que la mayoría es capaz de producir gelatinasa y amilasa (84% y 68% respectivamente), la capacidad hemolítica sólo se presentó en el 47% (figura 7).

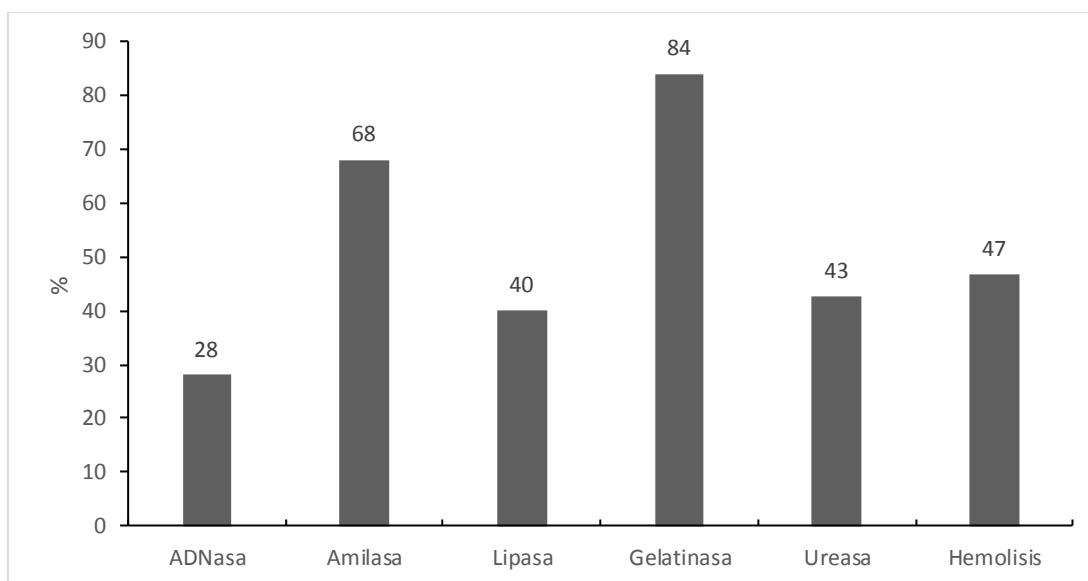


Figura 7. Producción de enzimas extracelulares por los cultivos aislados de los tres sitios de muestreo.

En la figura 8 se presentan los resultados de la producción de enzimas extracelulares para cada uno de los sitios de estudio.

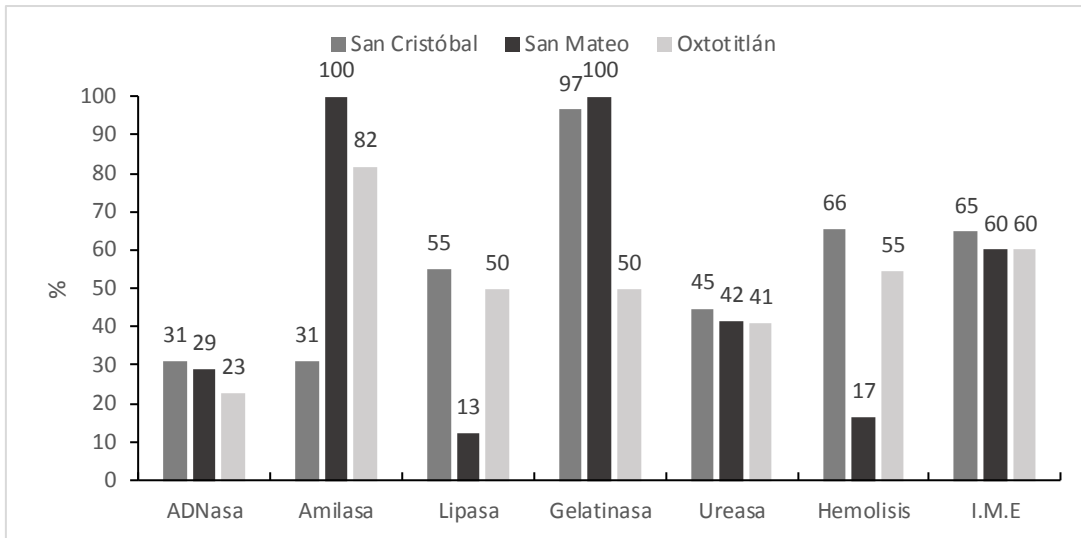


Figura 8. Producción de enzimas extracelulares y hemolisis, resultados de I.M.E de los cultivos aislados.

5.5 Selección de cultivos para las pruebas de sensibilidad y extracción de ADN

Se obtuvieron tres dendogramas tras aplicar el Coeficiente de Asociación de Jaccard, considerando su respuesta a la tinción de Gram, forma celular, utilización de sustratos, capacidad de producir enzimas extracelulares y capacidad hemolítica.

En el sitio de San Cristóbal se obtuvieron cinco grupos y tres cultivos individuales (figura 9) fueron seleccionados diez cultivos de acuerdo a las características antes mencionadas para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos y para su identificación molecular. En San Mateo se obtuvieron tres grupos y cuatro cultivos individuales, de igual forma se seleccionaron ocho cultivos para las pruebas antes mencionadas (figura 9).

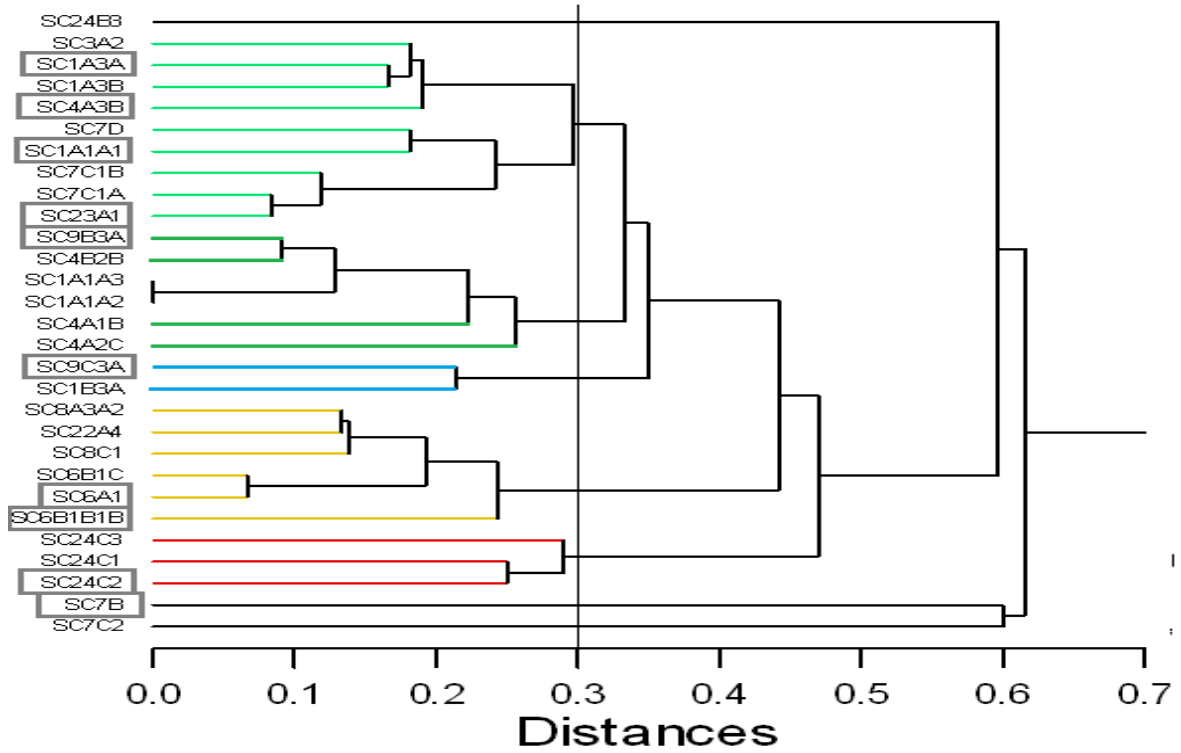


Figura 9. Formación de los grupos bacterianos de San Cristóbal.

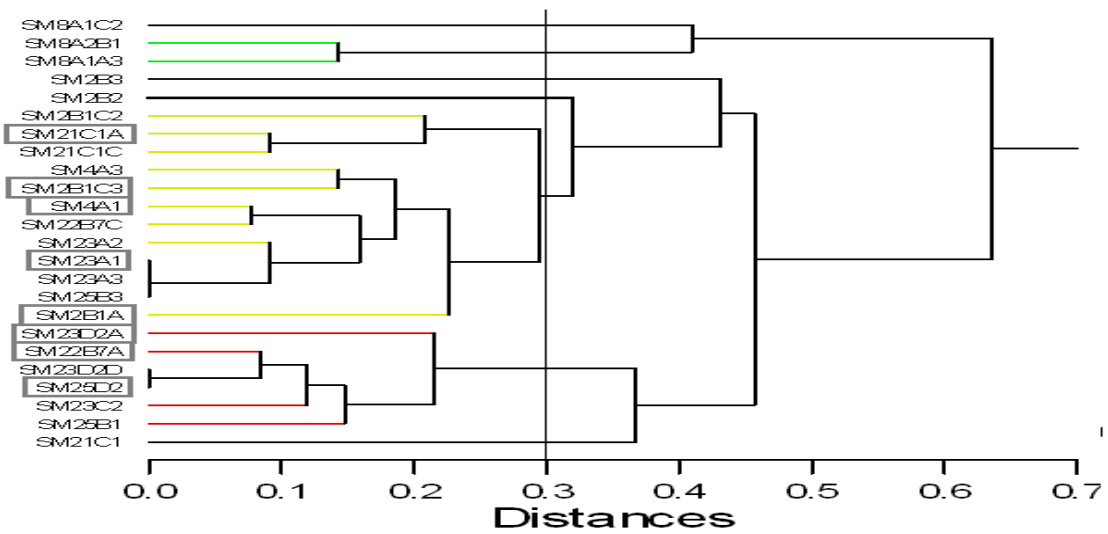


Figura 10. Formación de los grupos bacterianos de San Mateo.

En Oxtotitlán se obtuvieron cuatro grupos y nueve cultivos que no formaron parte de algún grupo y fueron seleccionados diez cultivos para las pruebas, para determinar su respuesta a 14 antibióticos y su identificación molecular (figura 11).

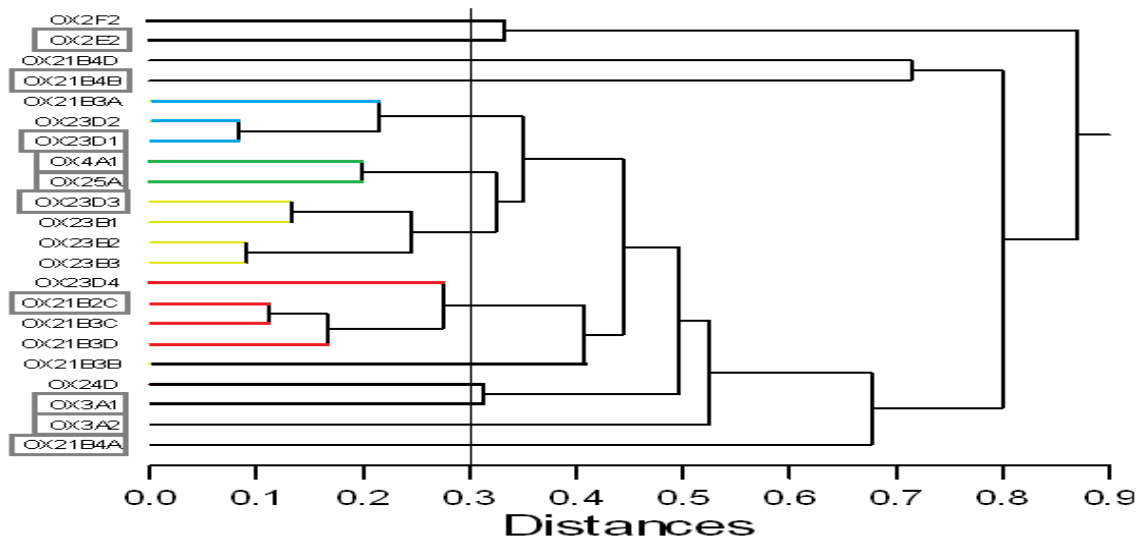


Figura 11. Formación de los grupos bacterianos de Oxtotitlán

5.6 Susceptibilidad bacteriana con los antibióticos ensayados

29 cultivos fueron seleccionados para la prueba de susceptibilidad la mayoría son Gram positivos, y solo uno fue Gram negativo. En las figuras 12, 13 y 14 se presentan las respuestas de los cultivos bacterianos a los antibióticos ensayados.

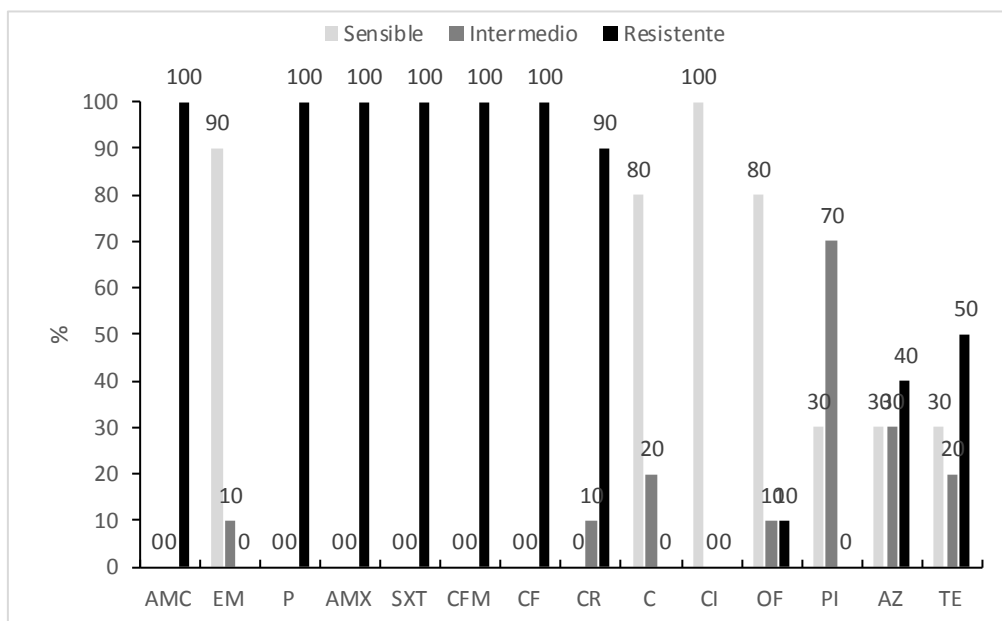


Figura 12. Respuesta de los cultivos bacterianos seleccionados de San Cristóbal, a los antibióticos ensayados. **AMC** amoxicilina / ácido clavulánico, **EM** eritromicina, **P** penicilina, **AMX** amoxicilina, **SXT** cotrimoxazol, **CFM** cefalexina, **CF** cefazolin, **CR** cefuroxima, **C**

cloranfenicol, **CI** ciprofloxacina, **OF** ofloxacina, **PI** piperacilina, **AZ** azitromicina, **TE** tetraciclina.

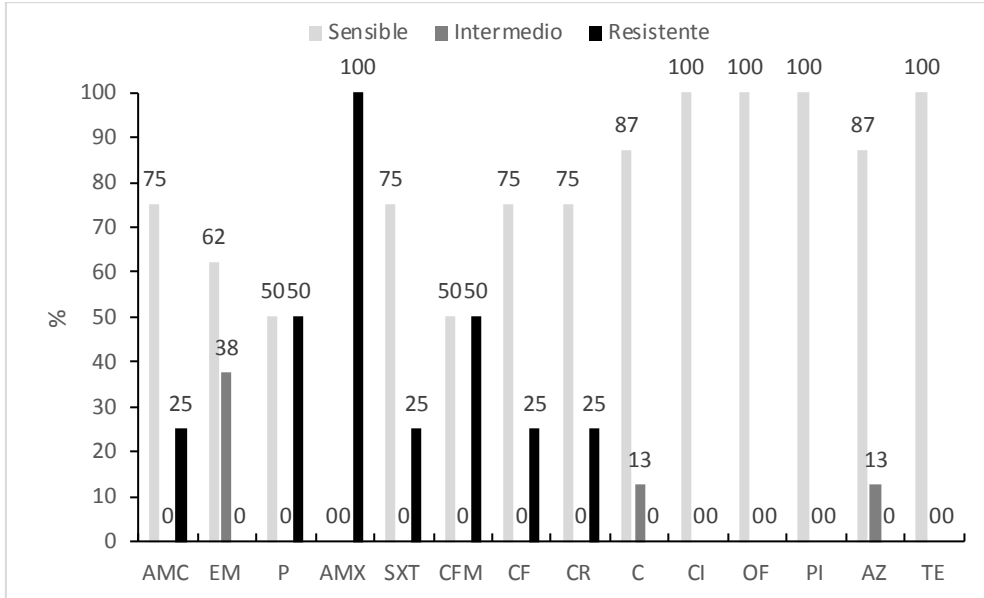


Figura 13. Respuesta de los cultivos bacterianos seleccionados de San Mateo, a los antibióticos ensayados. **AMC** amoxicilina / ácido clavulánico, **EM** eritromicina, **P** penicilina, **AMX** amoxicilina, **SXT** cotrimoxazol, **CFM** cefalexina, **CF** cefazolin, **CR** cefuroxima, **C** cloranfenicol, **CI** ciprofloxacina, **OF** ofloxacina, **PI** piperacilina, **AZ** azitromicina, **TE** tetraciclina.

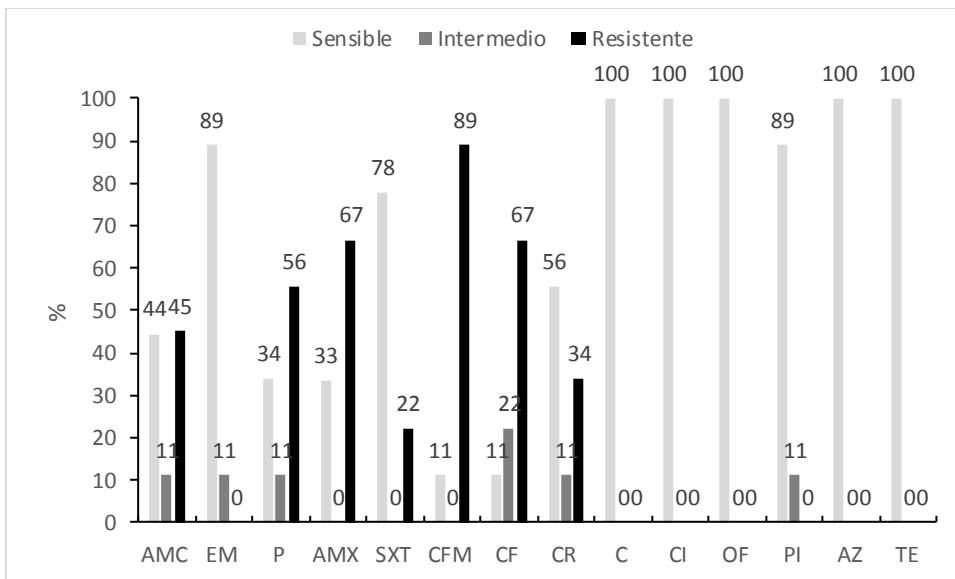


Figura 14. Respuesta de los cultivos bacterianos seleccionados de Oxtotitlán, a los antibióticos ensayados. **AMC** amoxicilina /ácido clavulánico, **EM** eritromicina, **P** penicilina, **AMX** amoxicilina, **SXT** cotrimoxazol, **CFM** cefalexina, **CF** cefazolin, **CR** cefuroxima, **C** cloranfenicol, **CI** ciprofloxacina, **OF** ofloxacina, **PI** piperacilina, **AZ** azitromicina, **TE** tetraciclina.

5.7 Extracción de ADN bacteriano

Dentro de los cultivos seleccionados se les extrajo el ADN, en las figuras 15a, 15b, 15c y 15d se muestra la electroforesis del ADN extraído amplificado el gen 16S ARNr, teniendo como producto de alrededor de 1500 pb. El + es un ADN ya extraído y amplificado dando resultado positivo para las pruebas (8F Y 149R), y el - es solo agua inyectable dando resultado negativo en la prueba. Del 1-10 son extracción del ADN de cultivos de San Cristóbal, del 11-18 son cultivos de San Mateo y del 19-28 son de Oxtotitlán.

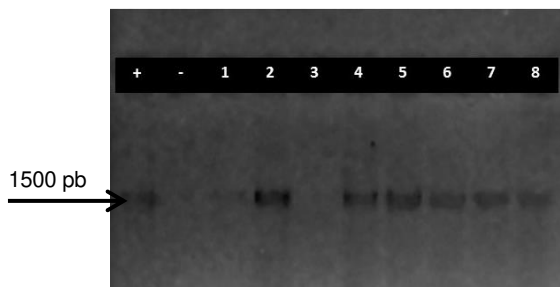


Figura 15a. + Positivo, - Negativo. 1 SC1a3a. 2 SC7b. 3 SC23a1. 4 SC4a3b. 5 SC9b3a. 6 SC9c3a. 7 SC1a1a1. 8 SC6a1

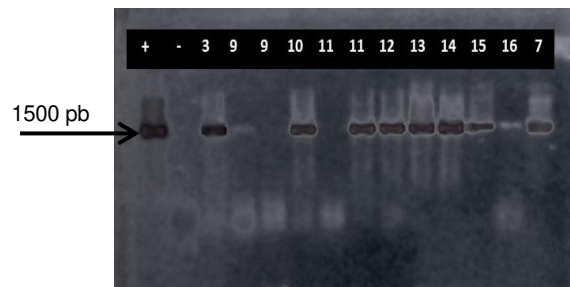


Figura 15b. + Positivo, - Negativo. 3 SC23a1. 9 SC6b1b1b. 10 SC24c2. 11 SM2b1c3. 12 SM4a1. 13 SM21c1a. 14 SM22b7a. 15 SM23a1. 16 SM23d2a. 7 SC1a1a1

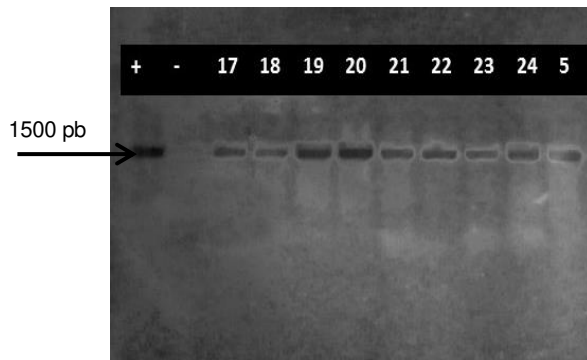


Figura 15c. + Positivo, - Negativo. 17 SM25d2. 18 SM2b1a. 19 OX2e1. 20 OX3a1. 21 OX3a2. 22 OX4a1. 23 OX21b2c. 24 OX21b4a.

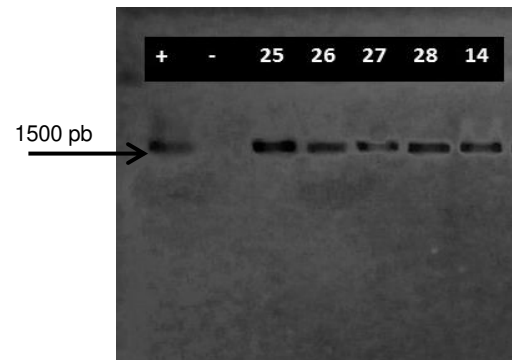


Figura 15d. + Positivo, - Negativo. 25 OX21b4b. 26 OX23b3. 27 OX23d1. 28 OX25a

Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR del 16S rARN de los cultivos seleccionados de los tres sitios muestreados.

De las secuencias obtenidas de los 28 cultivos seleccionados fueron comparadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando en análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool); 27 de los 28 cultivos tuvieron similitud con la base de datos (97%-99%), y solo uno, no se pudo comparar con este análisis.

Se obtuvieron 13 especies diferentes, siete pertenecientes al género *Bacillus*, tres a *Kocuria*, dos a *Staphylococcus* y una a *Exiguobacterium*, las especies identificadas así como sus características fenotípicas se presentan en la tabla 4.

De los géneros identificados con el gen 16S, el género *Bacillus* estuvo presente en los tres sitios de muestreo, *Staphylococcus* en San Cristóbal y San Mateo, *Exiguobacterium* solo en San Mateo y el generó *Kocuria* solo en Oxtotitlán.

Los cultivos seleccionados para la identificación molecular del sitio de San Cristóbal la mayoría se asocia al género *Bacillus*, excepto el cultivo SC24c2 que pertenece al generó *Staphylococcus*. Una de las características del generó

Bacillus es que la mayoría produce la enzima gelatinasa y en el caso particular de la especie *B. cereus* y *Bacillus. sp* son hemolíticas.

A pesar de que los cultivos SC7b, SM4a1, OX2e2, Ox3a2 y Ox23d1 pertenecen a la especie *Bacillus. sp*, la utilización de sustratos orgánicos y producción de enzimas extracelulares es diferente, aunque esto podría deberse que son de cultivos que provienen de diferentes sitios de muestreo.

Tabla 4. Características fisiológicas de las especies identificadas de los tres sitios de muestreo.

Clave del cultivo	Especie	Forma Celular	Gram	Glu	A Fac	Lac	Man	Fru	A Fac	Mal	Sac	Sor	Dex	AD
SC1a3a	<i>Bacillus cereus</i>													
SC23a1	<i>B. cereus</i>													
SC9b3a	<i>B. cereus</i>													
SC6a1	<i>B. cereus</i>													
SC6b1b1b	<i>B. cereus</i>													
SC7b	<i>Bacillus</i> sp													
SM4a1	<i>Bacillus</i> sp													
OX2e2	<i>Bacillus</i> sp													
OX3a2	<i>Bacillus</i> sp													
OX23d1	<i>Bacillus</i> sp													
SC4a3b	<i>Bacillus aryabhatai</i>													
SM2b1c3	<i>B. aryabhatai</i>													
SC9c3a	<i>Bacillus velezensis</i>													
SC1a1a1	<i>Bacillus megaterium</i>													
SM2b1a	<i>B. megaterium</i>													
OX3a1	<i>B. megaterium</i>													
SC24c2	<i>Staphylococcus succinus</i>													
SM21c1a	<i>Bacillus pumilus</i>													
SM22b7a	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>													
SM23d2a	<i>E. acetylicum</i>													

SM25d2	<i>E. acetylicum</i>														
SM23a1	<i>Staphylococcus epidermitis</i>														
OX4a1	<i>Bacillus turingensis</i>														
OX25a	<i>B. turingensis</i>														
OX21b2c	<i>Kocuria rhizophila</i>														
OX21b4a	<i>Kocuria marina</i>														
OX21b4b	<i>Kocuria indica</i>														
OX23b3	<i>Sin Similitud</i>														

Glu: Glucosa, **A. Fac:** Anaerobio Facultativo, **Lac:** Lactosa, **Man:** Manitol, **Fru:** Fructosa, **Mal:** Maltosa, Sorbitol, **Dex:** Dextrosa, **ADN:** ADNasa, **Ami:** Amilasa, **Lip:** Lipasa, **Gel:** Gelatinasa, **Ure:** Urea, **Hem:** Hemolisis

Las características de los dos cultivos identificados como *Bacillus. aryabhatai* (SC4a3b, SM2b1c3) ambos utilizan a la maltosa, sacarosa, sorbitol y dextrosa como fuente de energía y la producción de la enzima gelatinasa. *B. megaterium* (SC1a1a1, SM2b1a y OX3a1) comparte algunas características de *B. aryabhatai* puesto que *B. megaterium* produce la enzima amilasa.

Las especies *E. acetylicum*, *S. epidermitis* y *B. turingensis* comparten características fisiológicas parecidas, incluso casi iguales, una diferencia es que *E. acetylicum* y *B. turingensis* son bacilos y *S. epidermitis* es de forma cocal.

Las especies identificadas del generó *Kocuria* fueron los cultivos que utilizaron muy poco a los azúcares como fuente de carbono, así como su poca capacidad de enzimas extracelulares; aunque *K. rhizophila* fue la única que ocupó la gran mayoría de los sustratos orgánicos.

En la tabla 5 se puede observar los antibióticos ensayados por especie, donde muestra que la mayoría de las especies encontradas son resistentes a los antibióticos AMC, P, AMX, SXT, CFM, CF y CR, solo *B. cereus* (SC23a1, SC9b3a, SCa1 y SC7b) es resistente a AZ y TE; así mismo *S. succinus* (SC24c2) a OF y AZ.

Algunas especies empiezan a presentar sensibilidad intermedia a algunos antibióticos como EM, CR, C, PI, AZ y TE. Las bacterias presentan sensibilidad débil ante EM, C, CI, OF, PI, AZ y TE.

Tabla 5. Respuesta de los cultivos bacterianos a los antibióticos ensayados.

Cepa	Especie	AMC	EM	P	AMX	SXT	CFM	CF	CR	C	CI	OF	PI	AZ	TE
SC1A3A	<i>Bacillus cereus</i>	■		■	■	■	■	■	■				■	■	■
SC23A1	<i>B. cereus</i>	■		■	■	■	■	■	■				■	■	■
SC9B3A	<i>B. cereus</i>	■		■	■	■	■	■	■				■	■	■
SC6A1	<i>B. cereus</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■			■	■	■
SC6B1B1B	<i>B. cereus</i>	■		■	■	■	■	■	■			■		■	
SC7B	<i>Bacillus sp</i>	■	■	■	■	■	■	■	■				■	■	■
SM4A1	<i>Bacillus sp</i>		■	■	■	■	■	■	■					■	
OX2E2	<i>Bacillus sp</i>			■	■	■	■	■	■						
OX3A2	<i>Bacillus sp</i>	■		■	■	■	■	■	■						
OX23D1	<i>Bacillus sp</i>	■		■	■	■	■	■	■						
SC4A3B	<i>Bacillus aryabhatai</i>	■		■	■	■	■	■	■						■
SM2B1C3	<i>B. aryabhatai</i>				■	■	■	■	■						
SC9C3A	<i>Bacillus velezensis</i>	■		■	■	■	■	■	■				■		■
SC1A1A1	<i>Bacillus megaterium</i>	■		■	■	■	■	■	■						
SM2B1A	<i>B. megaterium</i>				■	■	■	■	■						
OX3A1	<i>B. megaterium</i>	■		■	■	■	■	■	■	■					
SC24C2	<i>Staphylococcus succinus</i>	■		■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■
SM21C1C	<i>Bacillus pumilus</i>	■		■	■	■	■	■	■	■					
SM22B7A	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>				■	■	■	■	■						
SM23D2A	<i>E. acetylicum</i>	■		■	■	■	■	■	■						
SM25D2	<i>E. acetylicum</i>			■	■	■	■	■	■						
SM23A1	<i>Staphylococcus epidermitis</i>		■		■	■	■	■	■						
OX4A1	<i>Bacillus turingensis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■				■		
OX25A	<i>B. turingensis</i>						■	■	■						
OX21B2C	<i>Kocuria rhizophila</i>						■	■	■						
OX21B4A	<i>Kocuria marina</i>			■	■	■		■	■						
OX21B4C	<i>Kocuria indica</i>	■		■	■	■	■	■	■						

Resistente	■
Intermedio	■
sensible	□

6 Discusión

Es bien sabido que la calidad del aire exterior afecta significativamente la salud humana y el ecosistema, a nivel mundial se observó un fuerte aumento de la contaminación del aire exterior durante las últimas décadas, dichos contaminantes entre ellos biológicos como bacterias y hongos, son transportados en el aire causando problemas de salud pública y de los ecosistemas (Jacob et al., 2016).

Se han realizado muy pocos estudios de la sobrevivencia de bacterias en el aire, puesto que algunas no pueden crecer al ser anaerobias facultativas lo que las hace muy sensibles y no puedan crecer, además las bacterias presentes en el aire son más sensibles a los métodos de recolección y cultivo (Tang, 2009).

Los promedios de UFC reportados en este estudio, no muestran similitud con lo encontrado en otros autores, Reanprayoon y Yoonaiwong (2010) reportan un crecimiento de 9.62×10^4 , siendo que el presente estudio el valor más alto fue de 103 UFC en el sito de San Mateo. Bragoszewska et al. (2017), presentan valores más altos que en la presente investigación, aunque podría ser comparable ya que encontraron un crecimiento de UFC de 265, aunque esto podría deberse a la temporada en que se realizan las investigaciones, pues en ciertas épocas del año hay más crecimiento de UFC.

Los factores ambientales como humedad, temperatura, velocidad del viento juegan un papel importante en la presencia y sobrevivencia de las bacterias aerotransportadas, también, las concentraciones de estas varía por región, por la estrategia de muestreo y la temporada muestreada (Wu et al., 2012).

El aislamiento de cultivos puros es de suma importancia para poder comprender la fisiología y ecología de las especies bacterianas en el ambiente, sin embargo el crecimiento de las muestras no refleja una abundancia adecuada, puesto que las condiciones en laboratorio y ambientales donde estas se encuentran son completamente diferentes, sin embargo, las muestras obtenidas representan una parte significativa de las especies que se encuentran en estos ambientes (Bernard et al., 2000).

Las bacterias aisladas en este trabajo la mayoría de ellas fueron bacterias Gram positivas, esto podría deberse que la sobrevivencia de las bacterias Gram negativas se da a bajas temperaturas y por presencia de pequeñas gotas que se pueden encontrar suspendidas en el aire, debido a su evaporación hacen más rápida su desecación de estas bacterias (Tang, 2009).

La mayoría de las bacterias pueden usar varios compuestos como fuentes de carbono, estas fuentes pueden ser usadas preferentemente de acuerdo como sean más accesibles y que a las bacterias les permitan un crecimiento más rápido. Uno de los ejemplos es del uso selectivo como fuente de carbono preferida es la glucosa, esto porque les permite un crecimiento más rápido en comparación con otros azúcares. La glucosa evita el uso de fuentes secundarias de carbono, un fenómeno denominado represión catabólica por carbono (CCR), esto es importante en entornos naturales ya que le permiten a las bacterias maximizar la tasa de crecimiento de su azúcar preferido (Gorke y Stulke, 2008; Brend et al., 2016). En este estudio la glucosa presentó menor porcentaje de utilización a comparación con maltosa, sacarosa y dextrosa, esto puede deberse al tipo de bacterias aisladas, la procedencia de las mismas o bien, la preferencia de otro tipo de sustrato que no es glucosa.

El éxito y sobrevivencia de las bacterias está en el CCR pues es importante para la competencia en ambientes naturales, ya que la selección de la fuente de carbono preferida es un factor determinante en la tasa de crecimiento y, por lo tanto, un éxito competitivo con otros microorganismos, además tiene un papel crucial en la expresión de genes, que a menudo permiten que las bacterias accedan a nuevas fuentes de nutrientes (Gorke y Stulke, 2008).

Esta expresión de genes es muy importante, por ejemplo, en la utilización de maltosa, requiere que las bacterias expresen genes relacionados con la captación de maltosa en el cual intervienen diferentes tipos de enzimas para lograr utilizar a la maltosa, la CCR permitirá utilizar los diferentes tipos de carbono presentes en el medio para que las bacterias puedan utilizarlos y así sobrevivir en ambientes como el aire (Moat et al., 2002). Los cultivos aislados en el presente trabajo tiene

una diversidad al momento de utilizar los diferentes sustratos presentes en el aire, en especial, a los ensayados es dicho trabajo, puesto que la gran mayoría de los sustratos utilizados presentan más del 50% de utilización de los sustratos.

Si bien el crecimiento en glucosa por bacterias es más rápida a comparación de lactosa y sacarosa puesto que no todas las bacterias son capaces de utilizar a la sacarosa como fuente de carbono, aunque este sustrato es muy fácil de encontrarse en el medio es difícil que las bacterias la utilicen como medio de energía para lograr su éxito de sobrevivencia (Chu et al., 2002), en el presente trabajo la utilización de sacarosa es mayor a la glucosa, esto podría deberse a lo antes mencionado, que las bacterias maximizan su crecimiento en los azúcares de su preferencia o bien por el CCR.

La caracterización de las enzimas extracelulares microbianas es importante para comprender su papel en la patogenicidad de enfermedades infecciosas, ya que desempeñan un papel importante en la causa de la citotoxicidad, así como para su aplicación en la biotecnología, por ello la importancia de los aislamientos, aunque hay muy pocos trabajos o casi nulos sobre el perfil enzimático de los aislamientos ambientales (Sharma y Tiwari, 2005).

La producción de enzimas extracelulares por parte de las bacterias aisladas en el presente trabajo presente mayor producción en gelatinasa, amilasa, actividad hemolítica, ureasa, lipasa y ADNasa. Las enzimas consideradas para su aplicación en la biotecnología están la gelatinasa, amilasa y lipasa; la gelatinasa ha recibido una gran atención considerable en el desarrollo de fármacos; así como en medios industriales, por su facilidad de extracción de esta enzima y el bajo coste que esta representa (Balan et al., 2012), por otro lado, con un 68% de producción la enzima amilasa igual tiene amplias aplicaciones en la industria textil, papelera y alimentación, por ejemplo por ejemplo en la fabricación de jarabes de pan, glucosa y fructosa, edulcorantes y bebidas alcohólicas, por ejemplo las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* se ha utilizado ampliamente en las industrias para la producción de α -amilasa (Azad et al., 2011).

Así mismo las bacterias capaces de producir la enzima lipasa son utilizadas en numerosos procesos biotecnológicos que incluyen las industrias de alimentos, cuero, cosméticos, detergentes y farmacéuticas y de desechos industriales. Algunas generadores de bacterias que producen lipasa son los *Bacillus*, también son importante en el proceso de biorremediación pues bacterias crecen fácilmente en ambientes contaminados por petróleo (Biswas et al., 2016).

Las enzimas capaces de contribuir a una patogenicidad están la urea, ADNasa y la capacidad hemolítica. Por ejemplo la ureasa presento una producción del 45% de los cultivos aislados en esta investigación, la urea protege a las bacterias contra el gástrico al neutralizar el ácido con el amoniaco generado y esto les ayuda a colonizar estómagos de diferentes mamíferos, lo cual está relacionada con la virulencia de bacterias patógenas (Lee y Calhoun 1997, Cheng y Cord-Ruwisch, 2013).

Las bacterias patógenas producen ADNasa, esta enzima en particular, aún está en investigación pues varios autores dicen que esta enzima juega un papel importante en la diseminación y propagación de bacterias infectantes mediante la licuefacción de pus, además de que las bacterias que producen este tipo de enzima, evaden la respuesta inmune innata al degradar las trampas extracelulares de neutrófilos (Sumbly et al., 2005). Así mismo las bacterias hemolíticas como regla son patógenas, es raro encontrar bacterias no patógenas que también sean hemolíticas, por lo tanto, la hemólisis es una indicación altamente predictiva de que una bacteria es patógena (Sum et al., 2017).

La resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos humanos existía antes del uso de estos fármacos por el hombre y su prevalencia era baja. Los estudios realizados con bacterias obtenidas en los años previos al descubrimiento de los antibióticos o con bacterias de poblaciones humanas que no habían tenido acceso a ellos lo demuestran. Desde el uso masivo de los antibióticos se ha constatado a nivel mundial un aumento muy importante de la prevalencia de la resistencia (Alos 2015).

La aparición de cepas bacterianas resistentes a los medicamentos se debe a la presión de selección impuesta por el uso de antibióticos, la intensidad de este evento natural es impulsada por el volumen de consumo de antibióticos de una población, ya sea apropiada o no, la identificación de las tendencias espaciales y temporales en el consumo de antibióticos es importante para comprender la epidemiología de la resistencia a los antibióticos, en la actualidad el uso de antibióticos no lo es solo para tratamientos de infecciones humanas, sino, también en la agricultura, cría de animales (en su ejemplo de peces) con la posibilidad de que grandes cantidades de dichos compuestos puedan ingresar a hábitats naturales (Martínez 2018). Para los cultivos aislados en el presente trabajo, los antibióticos que presentaron mayor resistencia fueron amoxicilina, cefalexina, penicilina, cefazolin y amoxicilina/ácido clavulánico y las más sensibles fueron ciprofloxacina, ofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, piperacilina y azitromicina.

En su plan de acción contra el crecimiento de la resistencia, la OMS esboza las actividades a diferentes niveles, que incluyen: generar y compartir información epidemiológica; aplicación de medidas de prevención de infecciones; Optimizar el uso de antibióticos a través del desarrollo de políticas nacionales y globales sobre el consumo y producción de antibióticos; restricciones sobre el consumo de antibióticos como promotores del crecimiento en ganado, y un uso razonado para el consumo humano. Además de estímulos para el estudio y desarrollo en el área¹⁰. Es evidente que se tienen que implementar acciones drásticas, porque de no hacerlo pronto viviremos en la «época pos antibióticos» (WHO 2014).

Bacillus, *Staphylococcus*, *Exiguobacterium* y *Kokuria* fueron los géneros encontrados en este estudio, algunos de estos géneros, igual son reportados por García-Mena et al. (2016) en su estudio realizado en la Ciudad de México.

Del género *Bacillus*, fue identificada *Bacillus cereus*, esta, es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, frecuentemente encontrado como saprofita en el suelo, agua, vegetación y aire forma esporas resistentes a condiciones adversas del medio, como altas temperaturas, deshidratación y radiación, produce gran

cantidad de toxinas que contaminan gran variedad de alimentos, las esporas le confieren resistencia a tratamientos como la pasteurización o procesos de cocción de los alimentos, además produce enzimas como, amilasas, lipasas, proteasas entre otras. A esta bacteria se le atribuyen dos síndromes, el emético y el diarreico (Pérez et al., 2012 y Sánchez et al., 2016).

También fue identificado *Bacillus sp.*, Estas bacterias han demostrado tener una amplia distribución en todas las regiones geográficas del planeta; estudios recientes se han centrado en la capacidad de actuar como bacterias bioprotectoras y promotoras del crecimiento vegetal, pues fungen como control biológico de microorganismos fitopatógenos, así mismo, participan en la nutrición mineral y la fijación biológica de nitrógeno, son productoras de sustancias con actividad funguicida y bactericida (Orberá et al., 2005).

Otra especie identificada fue *Bacillus aryabhatai* esta se aisló por primera vez en criotubos para recoger aire de la atmósfera superior (Pillai et al., 2017), aunque en los últimos años se ha encontrado en el suelo, promoviendo el crecimiento de diversas plantas y vegetales, entre ellas están, la soja y el arroz, Park et al. (2017) en el estudio que realizaron, mostraron que *B. aryabhatai* es capaz de alojarse con éxito en las raíces de estas plantas dando como resultado, una longitud de brote, tamaño de hoja y número de nudos significativamente mayor al grupo control, también en su estudio se dieron cuenta que reduce el estrés en las plantas por el calor.

Bacillus velezensis igual fue identificada, es una bacteria Gram positiva, creciendo a temperaturas de 15 a 45 °C, tiene similitud con *Bacillus amyloliquefaciens*. En los últimos años se ha aislado de las raíces del maíz, tiene una actividad anti fúngica (más del 70% de eficacia de control) contra muchas enfermedades de las plantas, puede usarse para controlar tanto las plagas como las enfermedades fúngicas de las plantas puede producir metabolitos secundarios con actividades antimicrobianas, también ha sido utilizada para la eliminación de colorantes azoicos. (Nam et al., 2009 y Roh et al., 2009).

Así mismo, *Bacillus megaterium*, es una bacteria Gram positiva, principalmente aeróbica formadora de esporas que se encuentra en hábitats muy diversos, desde el suelo hasta el agua de mar, sedimentos etc. puede crecer en medios simples en más de 62 fuentes de carbono, se ha convertido en un organismo industrial ideal pues entre sus productos se encuentran proteínas como la penicilina acilasa (utilizada para fabricar penicilinas sintéticas), toxinas fungicidas y oxetonocina que es un inhibidor viral activo en el VIH, virus de la hepatitis B.

Siguiendo con especies del género *Bacillus*, esta *Bacillus thuringiensis*, esta bacteria es Gram positiva aeróbica, se caracteriza por la producción de una inclusión esporas de origen proteico o endotoxina durante la fase de esporulación, responsable del efecto insecticida que se produce cuando son ingeridas por larvas de insectos de diferentes órdenes, tales como Lepidóptera, Díptera, Coleóptera e Himenóptera, la actividad tóxica, se extiende a protozoarios, trematodos, ácaros de intereses agrícola, mientras que a los mamíferos no se ha comprobado algún efecto (Romero et al., 2017).

Otra especie es *Bacillus pumilus*, Se ha aislado como único contaminante aparentemente en intoxicaciones alimentarias como en carne, huevos, productos y panadería han estado involucrados en las presuntas intoxicaciones alimentarias por esta bacteria, aunque también han encontrado sustancias bioactivas hacia células Vero en cepas de *B. pumilus*, también ha sido estudiado como agente de control biológico para *ceratitits capitata* (Suominen et al., 2001). Así mismo, *Bacillus pumilus*, se ha aislado como único contaminante aparentemente en intoxicaciones alimentarias como en carne, huevos, productos y panadería han estado involucrados en las presuntas intoxicaciones alimentarias por esta bacteria, aunque también han encontrado sustancias bioactivas hacia células Vero en cepas de *B. pumilus*, también ha sido estudiado como agente de control biológico para *ceratitits capitata* (Suominen et al., 2001).

Del género *Staphylococcus*, se identificó a *Staphylococcus succinus*, es un coco Gram positivo, aeróbicas, se conjuntan individualmente, en pares o en grupos irregulares. Reduce el sorbitol, reducción de nitrato y nitrito, esta bacteria ejerce

efectos supresores sobre la inflamación alérgica de las vías respiratorias como modelos murino (Place et al., 2002; Song et al., 2019). Otra especie de este género fue, *Staphylococcus epidermitis*, también es un cóco Gram positivo, coagulasa negativo, ha surgido como patógeno nosocomial en infecciones relacionadas con implantes médicos como catéteres, válvulas cardíacas, prótesis de cadera y lentes de contacto, relacionando su patogenicidad con la capacidad de producir biofilmes (polisacárido extracelular que promueve la adhesión célula-célula y es un factor de virulencia). También se ha encontrado un incremento de la resistencia a aminoglucósidos y β -lactámicos, en parte, como consecuencia de la presión selectiva a la que son sometidas por la exposición prolongada a estos antibióticos (Moreno-González y Ruiz-Galindo 2007; Pinilla et al., 2009).

Exiguobacterium acetylicum es una bacteria Gram positiva, colonias circulares de tamaño mediano pigmentadas en amarillo, es positivo para la utilización de maltosa, fructosa, dextrosa, manosa y manitol como únicas fuentes de carbono, es negativa para prueba de indol, reducción de nitrato, ADNasa; lactosa, xilosa, sorbitol como únicas fuentes de carbono. Esta bacteria es utilizada como promotora de crecimiento en plantas, pues estudios realizados como Selvakumar et al., (2010) mencionan que al inocular esta bacteria las plantas registran una raíz y un brote más grande a comparación de las plantas no inoculadas, así mismo esta planta ayuda a absorber nutrientes como N, P y K, esta es una especie extremófila, pues crece entre los 4 °C a los 42 °C.

Kocuria rhizophila es una bacteria coccidiforme Gram positiva, perteneciente a la familia Micrococcaceae del orden Actinomycetales, aislada de una amplia variedad de fuentes naturales, incluida la piel de mamíferos, suelo, rizosfera, muestras clínicas, agua dulce y sedimentos marinos, la característica que tienen las especies pertenecientes a *Kocuria* son altamente adaptables al nicho ecológico respectivo, *K. rhizophila* es una cepa de control de calidad en varias aplicaciones, incluidos en ensayos de susceptibilidad para una variedad de antibióticos, también a una alta variedad de solventes orgánicos (Takarada et al., 2008)

Kocuria marina es una bacteria cocoide Gram positiva, con una pigmentación de naranja y/o amarilla, crece en presencia de cloruro de sodio, aunque no se requiere la presencia de sal para su crecimiento, da positivo a la reducción de ureasa y nitrato, negativo para oxidasa, fosfatasa y producción de ácido a partir de glucosa, lactosa o sacarosa, se le atribuye algunos casos de peritonitis en los últimos años, aunque no ha sido muy estudiados estos casos (Lee et al., 2009).

Kocuria indica, son células positivas Gram positivas, de forma cocoide, aeróbicas, el color de la colonia es de color amarillo, da positivo a glucosa, manosa, ribosa, fructosa, glucógeno como única fuente de carbono, pero no en glicerol, arabinosa, xilosa, sorbosa, sorbitol, sacarosa (Syed et al., 2014).

7 CONCLUSIONES

- En San Mateo se registró el mayor número de UFC, lo cual obedecería a que es un sitio muy transitado, donde las personas y vehículos aportan que se suspendan bacterias en el aire.
- Se aislaron 29 cultivos bacterianos puros en San Cristóbal, 24 en San Mateo y 22 en Oxtotitlán, los bacilos Gram positivos fueron los más abundantes; los cultivos puros aislados utilizaron principalmente a la dextrosa como única fuente de carbono y energía.
- Se identificaron 13 especies de bacterias diferentes, la que predominó fue el género *Bacillus* con siete especies, seguido de *Kocuria* con tres especies, *Staphylococcus* con dos especies y *Exiguobacterium* con una especie, se reportó un cultivo que no se encontró similitud en el NCBI.
- De las especies reportadas, muestran que la mayoría son capaces de producir enzimas como gelatinasa y amilasa, así mismo la capacidad hemolítica. La mayoría de las especies encontradas son resistentes a AMC, P, AMX, SXT, CFM, CF y CR. De las especies reportadas se conoce que

solo algunas son de interés medica pues pueden poner en riesgo la salud de la población; pero de algunas son de gran utilidad en la biorremediación de ambientes o bien, son utilizadas como promotoras de crecimiento vegetal.

8 Referencias

Asad W, Asif M, Rasool SA. 2011. Extracellular enzyme production by indigenous thermophilic bacteria: partial purification and characterization of α -amylase by *Bacillus* sp. Pakistan Journal of Botany. 43(2):1045-1052.

Balan SS, Nethaji R, Sankar S, Jayalakshmi S. 2012. Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* ssp isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1:1811-1816.

Bauer H, Kasper-Giebl A, Löflund M, Giebl H, Hitzenberger R, Zibuschka F, Puxbaum H. 2002. The contribution of bacterial and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. Atmospheric Research 64:109-119.

Bernard L, Schafer H, Joux F, Courties C, Muyzer G, Lebaron P. 2000. Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. Aquatic Microbial Ecology. 23:1-11.

Biswas M, Sahoo S, Maiti S, Roy S. 2016. Isolation of lipase producing bacteria and determination of their lipase activity from a vegetative oil contaminated soil. International Research Journal of Basic and Applied Sciences 1(2):4-7.

Burrows SM, Elbert W, Lawrence MG, Pöschl U. 2009. Bacteria in the global atmosphere –Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. Atmospheric Chemistry and Physics. 9:9263-9280.

Bragoszewska E, Mainka A, Pastuszka JS. 2017. Concentration and Size Distribution of Culturable Bacteria in Ambient Air during Spring and Winter in Gliwice: A Typical Urban Area. 8(12): 2-13.

Bren A, Park JO, Towbin BD, Dekel E, Rabinowitz JD, Alon U. 2016. Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. 2016. Scientific Reports. 6:1-10.

Briones PR, Ríos ET, Calderón LFS, Bravo APV, Gómez CNM, Ocegüera CE. 2016. Compuestos contaminantes de la atmósfera: ¿Cuáles son sus efectos? y, sobre todo, ¿cómo eliminarlos? Ciencia. 68-74.

Chu C, Han C, Shimizu H, Wong B. 2002. The Effect of Fructose, Galactose, and Glucose on the Induction of β -Galactosidase in *Escherichia coli*. Journal of Experimental Microbiology and Immunology. 2:1-5.

Cheng L, Cord-Ruwich R. 2013. Selective enrichment and production of highly urease active bacteria by non-sterile (open) chemostat culture. Journal of Industrial Microbiol Biotechnol. 40:1095-1104.

Cox CS, Wether CM. 1995. Bioaerosols Handbook. Lewis Publishers, Nueva York, EUA. 656 p

De la Rosa MC, Mosso MA, Ullán C. 2002. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. Observatorio Medioambiental 5:375-402.

Elbert W, Taylor FE, Andreae MO, Pöschl U. Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions. Atmospheric Chemistry and Physics 7:4569-4588.

Görke B, Stülke J. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. Microbiology. 6:613-624.

Hernández-Cadena L, Téllez-Rojo MM, Sanín-Aguire LH, Lacasaña-Navarro M, Campos A, Romieu I. 2000. Relación entre consultas a urgencias por enfermedad respiratoria y contaminación atmosférica en Ciudad Juárez, Chihuahua. *Salud Pública de México* 42(4):288-297.

Herrera K, Cobar O, De León J, Rodas A, Boburg S, Quan J, Pernilla L, Mancilla C, Gudiel H. 2012. Impacto de la calidad microbiológica del aire externo en el ambiente interno de cuatro laboratorios de instituciones públicas en la ciudad de Guatemala y Bárcenas, Villa Nueva. *Revista Científica* 22 (1):30-38.

IMCO. 2014. ¿Cuánto nos cuesta la contaminación del aire en México? Instituto Mexicano para la competitividad. p. 13.

Jacob JH, Irshaid FI, Alhalib MA. 2016. Estimation and Identification of Airborne Bacteria and Fungi in the Outdoor Atmosphere of Al-Mafraq Area, Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences* 9(1):3-10.

Jiménez BE. 2001. La contaminación ambiental en México: Causas Efecto y Tecnología Apropriada. Limusa. México. p. 317-410.

Jones AM, Harrison RM. 2004. The effects of meteorological factor son atmospheric bioaerosol concentrations a review. *Science ot the Total Environment* 326:151-180.

Lacasaña NM, Aguilar GC, Romieu I. 1999. Evolución de la contaminación del aire e impacto de los programas de control en tres megaciudades de America Latina. *Salud Pública de México* 41(3):203-215.

Lee JY, Kim SH, Jeon HS, Oh SH, Kim HR, Kim YH, Lee JN. 2009. Two cases of peritonitis caused by *Kocuria marina* in patients undergoing continuous ambulatory peritonela dialysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(10):3376-3378.

Lee SG, Calhoun DH. 1997. Urease from a Potentially Pathogenic Coccoid Isolate: Purification, Characterization, and Comparison to Other Microbial Ureases. *Infection and Immunity*. 65(10). 3391.3996.

Maldonado-Vega M, Peña-Cabriales JJ, De Los Santos VS, Castellanos-Arévalo AP, Camarena-Pozos D, Arévalo-Rivas B, Valdés-Santiago L, Hernández-Valdez LJ, Guzmán DPL. 2014. Bioaerosoles y evaluación de la calidad del aire en dos centros hospitalarios ubicados en León, Guanajuato, México. *Revista Internacional Contaminación Ambiental* 30(4):351-353.

Martínez OM. 2013. Desarrollo e implementación de la Metodología para el muestreo y estudio de partículas viables (bioaerosoles). *Ciencias Biológicas de la Salud*. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. 52 p.

Méndez-Puentes CA, Camacho-Suárez JG, Echeverry-Hernández S. 2015. Identificación de bacterias y hongos en el aire de Neiva, Colombia. *Salud Publica* 17(5):728-737.

Moat AG, Foster JW, Spector MP. 2002. *Microbial Physiology*. Chapter 10. Metabolism of substrates other than glucose. 394-411 p.

Moreno-González ME, Ruiz-Galindo E. 2007. *Staphylococcus epidermidis* formador de biofilm en blefaronjuntivitis. *Revista Médica del Hospital General*. 70(1):24-29

Nam, MH, Park MS, Kim HG, Yoo S. J. (2009) Biological control of strawberry Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19:520-524.

Oyarzún MG. 2010. Contaminación aérea y sus efectos en la salud *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*. 26(1):16-25.

Orberá RT, Pérea IP, Ferrer DS, Cortés NR, González ZG. 2005. Aislamiento de cepas del género *Bacillus* sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Química*. 16(1):189-195.

Park YG, Mun BG, Kang SM, Hussain A. 2017. *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by

modulating the production of phytohormones. PLoS ONE 12 (3): e0173203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173203>

Pérez IP. 2012. *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. Revista Cubana de Salud Pública. 38(1):98-108.

Pillai AB, Kumar AJ, Thulasi k, Kumarapillai H. 2017. Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. Brazilian Journal of Microbiology. 48:451-460.

Pinilla G, Muñoz L, Ruiz AI, Chavarro B, Cifuentes Y. 2009. Aislamiento de *Staphylococcus epidermidis* portador de integrón clase 1 en un paciente con sepsis neonatal. Asociación Colombiana de Infectología. 13(3):196-202.

Place RB, Hiestand D, Burri S, Teuber M. *Staphylococcus succinus* subsp. Casei subsp. Nov., a Dominant Isolate from a Surface Ripened Cheese. Systematic and Applied Microbiology. 25:353-359.

Reamprayoon P, Yoonaiwong W. 2012. Airborne concentrations of bacteria and fungi in Thailand border market. Aerobiologia. 28:49-60.

Romero JLB, Canales EEC, Meneses PKH, Herbozo SFR. 2017. Aislamiento e identificación de *Bacillus thuringiensis* en cultivos de plátano, para la producción de bioinsecticidas. Big. Bang. Faustino. 6(1):15-18.

Roh JY, Liu Q, Choi JY, Wang Y, Shim HJ, Xu HG, Choi GJ, Kim JC, Je YH. 2009. Construction of a recombinant *Bacillus velezensis* strain as an integrated control agent against plant diseases and insect pests. J Microbiol Biotechnol. 19:1223-1229.

Sanchez J, Margarita C, Castañeda-Sandoval LM. 2016. *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. Revista Facultad Nacional de Salud Pública. 34(2):230-242.

Sánchez-Monedero MA, Roig A, Cayuela ML, Stentiford EI. 2006. Emisión de bioaerosoles asociada a la gestión de residuos orgánicos. Ingeniería 10 (1):39-47.

Selvakumar G, Kundu S, Joshi P, Nazim S, Gupta AD, Gupta HS. 2010. Indian Journal of Microbiol. 50:50-56.

Sharma A, Tiwari R. 2005. Extracellular enzyme production by environmental strains of *Serratia* spp. Isolated from river Narmada. Indian Journal of Biochemistry y Biophysics. 42:178-181.

Smets W, Moretti S, Denys S, Lebeer S. 2016, Airborne bacteria in the atmosphere: Presence, purpose, and potential. Atmospheric Environment 139:214-221.

Souminen I, Andersson MA, Andersson MC, Hallaksela AM, Kamper P, Rainey FA, Salkinoja-Salonen M. 2001. Sistematic and applied Microbiology. 24:267-276.

Sum R, Swaminathan M, Rastogi SK, Piloto O, Cheong I. 2017. Beta-Hemolyt Bacteria Selective Trigger Liposome Lysis, Enabling Rapid and Accurate Pathogen Detection. American Chemical Society. 2(10):1441-1451.

Sumby P, Barblan KD, Gardner DJ, Whitney AR, Welty DM, Long RD, Balley JR. 2005. Extracellular deoxyribonuclease made by goup A *Streptococcus assists* pathogenesis by enchancing evasion of the innate immune response. Proceeding of the National Academy of Sciences of Estados Unidos. 102(5):1679-1684.

Syed GD, Shan-Kun T, Srinivasan K, Lee JC, Li EJ. 2014. *Kocuria indica* sp. Nov., isolated form a sediment sample. International Journal of Systematic and Evlution Microbiolgy. 64:869-874.

Tang JW. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. Journal Royal Society Interface. 6:737-746.

Stetzenback LD. 2002. Introduction to aerobiology. En: Manual of Environmental Microbiology, 2^a Edition (Ed: C.J. Hurst). ASM. Press. Washington:801-813.

Takarada H, Sekine M, Kosugi H, Matsou Y, Fujisawa T. 2008. Complete genome sequence of the soil Actinomycete *Kocuria rhizophila*. 190(12):4139-4146.

Womack AM, Brendan JM, Green JL. 2010. Biodiversity and biogeography of the atmosphere. Philosophical Transactions Review Biogeography of the atmosphere. 365:3645-3653.

Wu YH, Chan CC, Chew GL, Shih PW, Lee CT, Chao HJ. 2012. Meteorological factors and ambient bacterial levels in a subtropical urban environment. International Journal of Biometeorol. 56(6):1001-1009.