



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Ambientales

Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales mención Sistemas Acuáticos
Continetales

VIABILIDAD DE BIOAEROSOL DEL DESIERTO DE ATACAMA EN AGUAS DE LAGOS PATAGÓNICOS

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales, mención Sistemas
Acuáticos Continetales

GUISELLA NINI ESCALANTE TRESIERRA

CONCEPCION – CHILE

2014

Profesor Guía: **Dra. Maria Angélica Mondaca**

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción, Chile

Profesor Co-Guía: **Dr. Roberto Urrutia**

Facultad de Ciencias Ambientales
Universidad de Concepción, Chile

Esta Tesis ha sido realizada en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción. Profesores Integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. María Angélica Mondaca

Profesor Guía de tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción, Chile



Dr. Roberto Urrutia

Profesor Co-Guía de tesis
Facultad de Ciencias Ambientales
Universidad de Concepción, Chile

Dr. Ricardo Barra

Evaluador Interno
Facultad de Ciencias Ambientales
Universidad de Concepción, Chile

Dr. Victor Campos

Evaluador Externo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción, Chile

Esta tesis está dedicada a las personas más importantes de mi vida:

A mis dos grandes amores.....mi bebe Ignacio y mi esposo Walter y a mi fortaleza.....mis padres Hugo y Violeta y hermanos Carmen y Hugo.

Ustedes son el motor de mi vida, siempre tuvieron una fe inquebrantable en mí y apoyaron constantemente en cada etapa.



“El éxito en la vida no se mide por lo que logras, sino por los obstáculos que superas”

Anonimo

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profunda gratitud a todos los que me han apoyado durante mis años de estudio de postgrado.

Primero que todo quiero agradecer a Dios porque sin el no soy nada, pero con el lo puedo todo.

Quiero dar las gracias a mi profesora guía Dra. María Angélica Mondaca, por su orientación y paciencia a lo largo de mis estudios. A Victor Campos por sus consejos y opiniones en esta investigación.

A las personas que fueron parte del Laboratorio de Microbiología Ambiental mientras realicé mi trabajo de tesis: Santiago Mafla, Rodrigo Riquelme, Benner Giacomozzi, Victor Guzmán, Carla Daza, Carla León, Luis Pereira e Iris Carrasco por la comprensión, apoyo y por los buenos momentos que vivimos en estos años.

A mis compañeros de la generación 2009 del Doctorado por la amistad y compañerismo que se formó. A las secretarias Lorena, Andrea y Liliana por su buena disposición y apoyo en todo lo académico.

A Carmen Alarcón, Claudia Fernandez y Andrea Torres gracias por su cariño, apoyo y palabras de aliento. Nos conocemos hace muchos años y más que una amistad nos une una hermandad.

A mi prima Mary Tresierra, quien se volvió un pilar muy importante para poder culminar esta tesis, gracias primita por tu ayuda, apoyo y principalmente por querer y cuidar a mi bebe como si fuera tuyo.

Quiero agradecer a mi padres Hugo y Violeta y hermanos Carmen y Hugo, quienes siempre han apoyado mis decisiones y nunca han perdido la fe en mí, ustedes me dieron el coraje para seguir adelante.

Finalmente quiero darle las gracias a mi esposo Walter, por ser mi apoyo, mi amigo, mi compañero a través de todos estos años. Gracias mi amor por no dejarme caer o perder la esperanza. Definitivamente debo haber hecho algo extraordinariamente increíble en la vida para tenerte a mi lado.

A mi bebe Ignacio, tu llegada cambio mi vida, eres mi motivación y mi fuerza para no rendirme nunca, te amo con toda mi alma.



Esta Tesis fue realizada con financiamiento otorgado por:

Becas para Estudios de Doctorado en Chile 21090424
Programa de Becas de Apoyo a la realización de la tesis
Doctoral N° 24110114



Programa Becas de Exención
Dirección de Postgrado
Universidad de Concepción



INDICE

INDICE	7
RESUMEN	15
ABSTRACT	18
CAPITULO I	20
INTRODUCCION	20
ANTECEDENTES GENERALES	21
AEROSOLES	21
BIOAEROSOLES	22
BACTERIAS TRANSPORTADAS POR EL AIRE	26
DISPERSIÓN Y DEPOSITACIÓN DE BIOAEROSOLES BACTERIANOS	30
IMPORTANCIA DE LAS BACTERIA TRANSPORTADAS POR EL AIRE	33
CAPITULO II	36
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	36
1. HIPOTESIS	37
2. OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GENERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
CAPITULO III	39
DETECCIÓN DE BACTERIAS DESDE BIOAEROSOLES DE ZONAS REMOTAS DE CHILE	39
RESUMEN	40
INTRODUCCIÓN	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
ZONAS DE MUESTREO	43
MUESTRAS DE BIOAEROSOLES	43
MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	44

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS VIABLES	44
RECuento DE CÉLULAS TOTALES	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
REFERENCIAS	51

CAPITULO IV	55
--------------------	-----------

UNUSUAL PATHOGENIC BACTERIUM ISOLATED FROM MICROBIAL COMMUNITIES OF BIOAEROSOLS AT CHILEAN PATAGONIAN LAKES	55
--	-----------

ABSTRACT	56
INTRODUCTION	57
MATERIAL AND METHODS	59
SAMPLING	59
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)	60
TOTAL DNA EXTRACTION, PCR AND DGGE OF THE BIOAEROSOL SAMPLES	60
ANALYSIS OF DGGE PROFILES	61
STRAIN ISOLATION AND IDENTIFICATION	61
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST	62
RESULTS AND DISCUSSION	62
REFERENCES	70

CAPITULO V	77
-------------------	-----------

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF AIRBORNE BACTERIA ISOLATED FROM ATACAMA DESERT IN CHILE	77
---	-----------

ABSTRACT	78
INTRODUCTION	79
MATERIAL AND METHODS	80
SAMPLING	80
STRAIN ISOLATION AND IDENTIFICATION	81
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING	81
ISOLATION OF PLASMID DNA	81
RESULTS AND DISCUSSION	82
REFERENCES	89

CAPITULO VI	95
VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS, PRESENTES EN BIOAEROSOLES GENERADOS EN LA ZONA DE HUARA, EN LAGOS DE LA PATAGONIA	95
RESUMEN	96
INTRODUCCIÓN	97
MATERIALES Y MÉTODOS	98
TOMA DE MUESTRAS	98
EXPERIMENTO EN MICROCOSMOS	99
RECuento DE CÉLULAS VIABLES	100
EXTRACCIÓN DIRECTA DEL ADN DESDE LAS MUESTRAS DE MICROCOSMOS	101
AMPLIFICACIÓN DE ADNr 16S DE LAS MUESTRAS DE MICROCOSMOS	101
ANÁLISIS POR DGGE DE LAS MUESTRAS DE MICROCOSMOS	101
PERFIL METABÓLICO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS PRESENTES EN LOS DIFERENTES MICROCOSMOS	102
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	102
REFERENCIAS	117
CAPITULO VII	125
DISCUSION	125
CAPITULO VIII	135
CONCLUSIONES	135
CAPITULO X	138
REFERENCIAS	138

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO II

Fig.1 Concentraciones de bacterias en zonas cercanas a la superficie (10^3 m^{-3}) basados en el modelo de Burrows et al. (2009) 28

Fig. 2 Esquema de los procesos típicos que determinan la composición de las comunidades bacterianas del aire 29

CAPITULO III

Fig. 1 Microscopia electronica de barrido (MEB) de bioaerosoles atrapados en filtros de membrana de nitrocelulosa en lagos de la Patagonia Chilena; A: Lago Alto; B: Lago Verde; C: Lago Esponja; D: zona desértica de Huara 45

Fig. 2 Recuento total de células viables presentes en muestras de bioaerosoles de tres Lagos Patagónicos y de la zona desértica de Huara 46

Fig.3 Porcentage de bacterias de forma cocacea, bacilos y cocobacilos presentes en las muestras de Bioarsoles de lagos Patagónicos y de la zona desértica de Huara 48

Fig.4 Porcentage de Bacterias Gram positivas y Gram negativas presentes en las muestras de bioaerosoles de lagos Patagónicos y de la zona desértica de Huara 49

CAPITULO IV

Fig. 1 Scanning Electron Microcopy (SEM) from bioaerosol trapping filter membranes at Chilean Patagonian lakes. A: Alto lake; B: Esponja lake; C: Verde lake 63

Fig. 2 DGGE (40-80% denaturant gradient) of 16S rDNA products amplified with the primers P2 and P3 (GC-clamp) from bioaerosols trapping filter membranes at Chilean Patagonian lakes. The bands indicated in the figure were excised re-amplified, purified and sequenced. F1: Alto lake; F2: Esponja lake and F3: Verde lake 64

Fig. 3 Multidimensional scaling (MDS) of the DGGE data matrix of bacterial rDNA fragments from the Alto, Esponja and Verde Lake. Similarity index was evaluated by percentages 65

CAPITULO V

Fig. 1 Agarose gel (1.5%) of IncP oriT PCR product from plasmid found in bacterias isolated from bioaerosols of Huara zone. Lane 1, 23 strain; lane 2, 181 strain; lane 3, 249 strains; lane 4, 250 strain; lane 5, 252 strain; lane 6, 253 strains; lane 7, 300; lane 8, positive control. 86

Fig 2. Agarose gel (1.5%) of IncP *trfA1* PCR product from plasmid found in bacterias isolated from bioaerosols of Huara zone. Lane 1, 23 strain; lane 2, 181 strain; lane 3, 249 strains; lane 4, 250 strain; lane 5, 252 strain; lane 6, 253 strains; lane 7, 300.; lane 8, positive control. 86

CAPITULO VI

Fig.1 Recuento de células viables en muestras de microcosmos A (lago+arena) y B (lago+bioaerosoles) de cada uno de los Lagos estudiados 104

Fig.2 Actividad metabólica calculada para el microcosmos A y B de los lagos Alto, Verde y Esponja 112

Fig. 3 Actividad metabólica calculada a partir de los valores de absorbancia de Biolog Ecoplate para los tres microcosmos (A,B y D) de cada lago después de 96 h de incubación 115

Fig.4 Modelo de Dispersión de bacterias desde la arena al aire mediante bioaerosoles y su posible depositación a distancias largas desde su origen. Modificado de Niznansky, B. National Weather Service Forecast Office. (2010) 116



INDICE DE TABLAS

CAPITULO II

Table 1 Identificación de bacterias desde bioaerosoles de la zona de lagos Patagónicos y la zona de Huara	50
--	----

CAPITULO III

Table 1. Analysis of 16S rDNA sequences obtained by DGGE	66
---	----

Table 2. Bacterial species isolated and identified from filter samples of Chilean Patagonian lakes	66
---	----

CAPITULO IV

Table 1 Bacterial species isolated and identified from bioaerosols samples isolated in Atacama desert, Chile	83
---	----

Table 2. Phenotypes of antibiotic resistance among airborne bacteria collected from Atacama desert	85
---	----

CAPITULO V

Tabla 1. Análisis de las secuencias del ADNr 16S obtenidos por DGGE en muestras de Microcosmos A y B del Lago Alto	111
---	-----

Tabla 2. Análisis de las secuencias del ADNr 16S obtenidos por DGGE en muestras de Microcosmos A y B del Lago Verde	112
--	-----

Tabla 3. Análisis de las secuencias del ADNr 16S obtenidos por DGGE en muestras de Microcosmos A y B del Lago Esponja

116



RESUMEN

El fenómeno de dispersión y posterior depositación de bioaerosoles, que consiste en la movilización a miles de kilómetros de distancia de material biológico, principalmente bacterias y hongos se ha incrementado en los últimos años debido a los efectos del Cambio Climático, como sequías prolongadas en diversas zonas desérticas, cambio en el régimen de pluviosidad y en los usos de la tierra, erosión y la pérdida de la cubierta herbácea protectora en amplias zonas del planeta (Prospero y Lamb 2003; Moulin y Chiapello 2006; Neff et al. 2008).

El destino ambiental de los bioaerosoles, depende de la dirección de los vientos y la temperatura, entre otros factores. El transporte de dichas partículas ocurre desde zonas o regiones cálidas y de menor latitud del planeta, a regiones más frías y de mayor latitud, como es el caso de las zonas de la Patagonia. Los bioaerosoles podrían acumularse en las regiones polares, donde la temperatura ambiental es más baja y permitiría la sedimentación de estas partículas (De La Rosa et al. 2002).

Numerosos trabajos han demostrado que las nubes de polvo atmosférico no solo sirven como fuentes periódicas de nutrientes e incluso de contaminantes como es el caso de los Compuestos Orgánicos Persistentes COPs (Arbelli 2009; Fernández y Grimalt 2003) sino también, sirven como un medio para el transporte global, de bioaerosoles que podrían llevar microorganismos patógenos y no patógenos. Estudios microbiológicos de material particulado han demostrado la movilidad de una comunidad bacteriana, a través de la atmósfera en nubes de polvo provenientes de zonas desérticas (Zhang et al. 2003; Washington et al. 2003; Griffin 2007).

El flujo de bacterias aerotransportadas podría representar una importante vía de colonización de ambientes remotos, como los lagos de la Patagonia. Estos lagos son considerados remotos y prístinos con ecosistemas que carecen de influencia antropogénica local pero con eventos recurrentes de depositación de partículas (aerosoles) (Catalan et al. 2006). Estos ecosistemas responden rápidamente a las perturbaciones ambientales y pueden considerarse como indicadores sensibles del cambio global (Catalan et al. 2006) emergiendo como un sistema conveniente para monitorear la dispersión bacteriana, debido a que en estos lagos se dan condiciones

ambientales extremas y particulares por su localización geográfica. Una perturbación causada por microorganismos aloctonos puede producir la desintegración de los microhabitats presentes (Torsvik et al. 2002).

Los microorganismos, juegan un rol importante en los ecosistemas lacustres debido a que son los principales responsables de la actividad biológica, la producción de biomasa, y remineralización en los sistemas lacustres, mientras que los organismos pertenecientes a niveles tróficos superiores (peces, crustáceos) juegan un rol menor. Todos estos procesos se pueden ver alterados o modificados, entre otras causas, debido al ingreso de especies de microorganismos aloctonos (Hans et al. 2003; Lekunberri et al. 2010).

Existen escasos estudios relacionados con la migración de microorganismos mediante el fenómeno de dispersión y depositación de bioaerosoles en Chile por lo que es importante estudiar los efectos que puede producir la presencia de microorganismos aloctonos en ecosistemas lacustres, lo que permitiría un mejor conocimiento de la respuesta de dichos ecosistemas frente a la influencia de agentes externos.

La dispersión de microorganismos patógenos o no patógenos hacia zonas remotas puede producir efectos en el ecosistema de lagos patagónicos tales como alteración de los ciclos biogeoquímicos y tramas tróficas y también puede llegar a producir diversas enfermedades en plantas, animales e incluso en el hombre (Griffin 2007).

Por lo mencionado anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la potencial viabilidad de bioaerosoles, en sistemas acuáticos remotos en experimentos de microcosmos.

Los resultados obtenidos demuestran en primer lugar la presencia de bacterias en las muestras de bioaerosoles de las zonas en estudio, muchas de estas bacterias han sido aisladas anteriormente por otros autores. Se logró aislar una cepa inusual en muestras de bioaerosoles de dos zonas de los lagos de la Patagonia en estudio. También se observó que muchas de las bacterias aisladas presentan resistencia a antibióticos de uso habitual en el ambiente hospitalario. Finalmente los resultados demuestran la viabilidad de los bioaerosoles en zonas remotas por lo tanto en la

eventualidad que las bacterias se trasladen en dichos bioaerosoles a grandes distancias, podrían llevar consigo genes de resistencia a antibióticos y toxinas (endotoxinas), llegar hasta zonas remotas ocasionando alteraciones y daño tanto al ecosistema como al hombre. En Chile, no existe información al respecto, los resultados obtenidos son pioneros en nuestro país y pueden servir como línea base para estudios posteriores.



ABSTRACT

The phenomenon of dispersion and later deposition of bioaerosols, that consists in the mobilization of biological material to thousands of kilometers of distance, mainly bacteria and fungi has been increased in the last years due to the effects of the Climate change, like droughts prolonged in diverse desert zones, change in the rainfall regime and the land uses, erosion and the loss of the protective cover grass in ample zones of the planet (Prospero and Lamb 2003; Moulin and Chiapello 2006; Neff et al. 2008).

The environmental destination of bioaerosols, depends on the wind direction and the temperature, among others factors. The transport of these particles occurs from warm zones or regions and low latitude of the planet, to colder regions and of high latitude, as it is the case of the zones of the Patagonia. Bioaerosols could be accumulated in the Polar Regions, where the environmental temperature is lower and allows that these particles settle down (De la Rosa et al. 2002).

Many works have demonstrated that the atmospheric dust clouds serve as periodic sources of nutrients and polluting agents as it is the case of Persistent Organic Pollutants (POPs) (Arbelli 2009; Fernandez and Grimalt 2003) but also, serve as a medium for the global transport, of bioaerosols who could carry pathogenic and nonpathogenic microorganisms. Microbiological studies of particulate material have demonstrated the mobilization of a bacterial community, through the atmosphere in dust cloud originated from desert zones (Zhang et al. 2003; Washington et al. 2003; Griffin 2007).

The flow of airborne bacteria could represent an important via of colonization of remote atmosphere, like Patagonian lakes. These Lakes are considered remote and pristine with ecosystems that lack of local anthropogenic influence but with recurrent events of deposition of particles (aerosols) (Catalan et al. 2006). These ecosystems respond to the environmental disturbances quickly and can be considered like sensible indicators of the global change (Catalan et al. 2006) emerging like a convenient system to monitor the bacterial dispersion, because in these lakes occur extreme and particular environmental conditions by their geographic location.

A disturbance caused by allochthons microorganisms can produce the desintegration of the present microhabitats (Torsvik et al. 2002). The microorganisms play an important roll in the lacustrine ecosystems because they are the main responsible of the biological activity, biomass production and remineralización in the lacustrine systems, whereas the organisms from superiors trophic levels (fish, crustaceans) play a smaller roll. All these processes can be seen altered or modified, among others causes, due to the entrance of allochthons microorganisms species (Hans et al 2003; Lekunberri et al. 2010).

Only a few studies exist, related to the migration of microorganisms via the dispersion and depositacton phenomenon of bioaerosols in Chile, reason why it is important to study the effects that can produce the presence of microorganisms allochthons in lacustrine ecosystems, which would allow a better knowledge of the response from these ecosystems against the influence of external agents.

The dispersion of pathogenic or nonpathogenic microorganisms to remote zones can produce effects in the Patagonian lakes ecosystem such as alteration of the biogeochemical cycles and trophic network and can also produce diverse diseases in plants, animal and even in the man (Griffin 2007).

By the mentioned previously, the objective of the present work was to study the potential viability of bioaerosols, in remote aquatic systems in microcosm experiments. The results show in first place the presence of bacteria in samples of bioaerosols of studied areas, many of these bacteria have been previously isolated by other authors. An unusual strain was isolated in samples of bioaerosols in two areas of the lakes of Patagonia in the study. It was also noted that many of the isolated bacteria are resistant to antibiotics commonly used in hospital environment. Finally, the results demonstrate the viability of bioaerosols therefore in the event that the bacteria in these bioaerosols travel long distances, could carry antibiotic resistance genes and toxins (endotoxins), reaching remote areas causing disturbances and damage to the ecosystem and to the man. In Chile, there is no information, the results are pioneers in our country and can serve as a baseline for further studies.

CAPITULO I



Antecedentes generales

Aerosoles

El material particulado atmosférico o aerosol es un contaminante del aire directamente emitido a la atmósfera a través de procesos de origen natural, como erosión del suelo, erupciones volcánicas, evaporación de agua de mar o a través de fuentes antropogénicas, que corresponden a las emisiones generadas por el hombre como la combustión de los motores de autos, hogares, actividades industriales, etc., o como aerosoles secundarios debido a las transformaciones químicas de los gases emitidos por el tráfico o la industria (Préndez et al. 1991; Tolgyessy 1993; Carreras et al. 2004; Morales-Baquero et al. 2006; Joksic et al. 2009).

En la atmósfera los aerosoles tienen efectos muy importantes para el ambiente. Representan un peligro para la población que los respira. Absorben radiación y además sirven como núcleos de condensación para formar nubes. Además, son superficies de contacto con gases para llevar a cabo transformaciones químicas. Por último y más grave aún, son vehículos que transportan microorganismos o células de microorganismos encapsulados, mezclados con material particulado biológico conocido como bioaerosoles (Eduard et al. 2012)..

Las partículas con un diámetro menor a $0.1\ \mu\text{m}$ no presenta un problema importante y aquellas partículas con un tamaño mayor a $10\ \mu\text{m}$ se encuentran solamente unas pocas horas suspendidas después de su emisión antes de ser removidas de la atmósfera mediante procesos de sedimentación o precipitación. Aquellas partículas con diámetro entre 0.1 y $10\ \mu\text{m}$ son el principal foco de interés y estudio ya que de acuerdo a la literatura pueden afectar la reflexión y dispersión de la luz solar incidente, la nubosidad y precipitación; además pueden permanecer en la atmósfera durante mucho tiempo y en consecuencia, pueden ser transportadas a grandes distancias desde el punto de emisión. (Tolgyessy 1993; De la Rosa et al. 2002; Joksic et al. 2009)

Bioaerosoles

Los bioaerosoles se pueden definir como partículas transportadas por el aire constituidos por partículas finas, moléculas de tamaño grande, compuestos orgánicos volátiles que están vivos o que proceden de un organismo vivo. En los bioaerosoles se pueden encontrar microorganismos como bacterias, virus y hongos (cultivables, totales y/o muertos), fragmentos, toxinas y partículas producto de residuos de todo tipo, cuyo origen es la materia viva (Ariya et al 2009; Jaenicke 2005).

La supervivencia y dispersión de los bioaerosoles en el aire, depende de las condiciones del entorno al cual estén expuestos, ya que factores como la temperatura, el movimiento del aire, la luz y la cantidad de sustrato que encuentren para alimentarse en el medio, van a determinar la cantidad de microorganismos presentes (Smets 2013).

Los nutrientes de estos microorganismos son variados, diferentes sustratos pueden suplir sus necesidades. De manera general los compuestos esenciales para su desarrollo son agua y materia orgánica; en otras palabras cualquier compuesto que tenga estas características es una zona colonizable para ellos.

El aire no se considera un hábitat bacteriano, las bacterias existen en el aire como contaminantes accidentales. Aunque esta afirmación anterior en la actualidad esta siendo replanteada, no se discute el hecho de que muchos microorganismos patógenos del aire están asociados a dos tipos de partículas: núcleos de pequeñas gotas, que son residuos de gotas evaporadas de la exhalación y otras más frecuentes son las partículas de polvo. Estos dos tipos de partículas son diferentes en cuanto a su origen, manera de depositarse, importancia en las enfermedades y a los métodos con los que deben ser valoradas y controladas (Olaya y Perez 2006).

Se pueden encontrar bioaerosoles en altitudes de hasta 41 kilómetros sobre el nivel del mar (Wainwright et al. 2003) donde viajan por impulso de las corrientes y muestran largos tiempos de residencia (Morris et al. 2008).

En general 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 va a estar gobernado por sus propiedades físicas (forma, tamaño y densidad) y las condiciones medioambientales (corrientes de aire, humedad y temperatura) (Sanchez-Monedero 2006).

Las partículas de mayor tamaño (con un diámetro aerodinámico superior a 10 μm) tienden rápidamente a sedimentar por la acción de las fuerzas gravitacionales, mientras que las partículas muy pequeñas (inferiores a 0.1 μm) son transportadas por movimientos brownianos y presentan un comportamiento similar a un gas, permaneciendo así en suspensión. Sin embargo, aquellas partículas con un diámetro aerodinámico entre 0.1 y 10 μm presentan un comportamiento intermedio ya que su movimiento está afectado en mayor o menor medida por ambos tipos de fuerzas (Sanchez-Monedero 2006).

Los factores ambientales, además de gobernar el comportamiento aerodinámico de los bioaerosoles, también determinan su estabilidad y viabilidad. Los microorganismos en suspensión están expuestos a distintos tipos de estrés ambiental que dan lugar a su inactivación. El hecho de que estas partículas puedan permanecer en suspensión, sean viables y fácilmente transportables por el viento, las convierte en uno de los principales problemas ambientales que puede influir en el clima, salud pública, etc, a escala regional y/o mundial (Griffin et al. 2001; Próspero et al. 2005; Lohmann y Feichter 2005; Keene y Galloway 1988; Kanakidou et al. 2005; Sun y Ariya 2006; Fuzzi et al. 2006; Elbert et al. 2007; Möhler et al. 2007).

El destino ambiental de los bioaerosoles, entre otros factores, depende de la dirección de los vientos y de la temperatura; el transporte de las partículas atmosféricas va desde zonas o regiones cálidas y de menor latitud del planeta a regiones más frías y de mayor latitud. (De La Rosa et al. 2002). La atmósfera es el principal medio de transporte para la distribución mundial de los bioaerosoles. La asociación entre las partículas que lo conforman aumenta su velocidad de eliminación desde la atmósfera por procesos de deposición seca y húmeda.

De acuerdo con este mecanismo, la mayoría de los bioaerosoles, podrían acumularse en las regiones polares, donde la temperatura ambiente es baja lo que les permite depositarse. Las zonas remotas son ecosistemas únicos para el estudio

de estas partículas y los lagos situados en estas zonas constituyen ecosistemas estables donde la influencia del ingreso de los bioaerosoles transportados atmosféricamente puede ser monitoreada. (De La Rosa et al. 2002)

Griffin et al (2001) y Kellogg y Griffin (2006), en sus resúmenes de mediciones que realizaron en varios muestreos de partículas de tierra durante diversos eventos de tormentas de polvo, muestran que los microorganismos pueden encontrarse formando parte de las partículas de polvo y así son transportados a largas distancias en la atmósfera.

Mediante imágenes satelitales se han observado densas neblinas de polvo provenientes de las regiones áridas de África, Asia y Medio Oriente, las cuales a menudo cubren grandes áreas de los océanos Atlántico, Pacífico e Índico en dirección de los vientos. Estas tormentas y plumas de polvo tienen a los bioaerosoles como los componentes principales, más destacados y persistentes (Burkow y Kallenborn 2000; Griffing et al. 2001; Prospero et al. 2005; Reche et al. 2009).

Los desiertos más grandes del planeta, que incluyen las regiones del norte de África del Sahara y Sahel y los desiertos de Asia, Gobi, Takla Makan, y Badain Jaran, son las principales fuentes de movilización de los polvos del desierto a grandes distancias a través la atmósfera. (Griffing 2007; Hervás et al. 2009). La cantidad anual de polvo del desierto que permite las migraciones aéreas regionales o globales es de 0,5 a 5,0 billones de toneladas. Las regiones de África, contribuyen con casi un billón de toneladas métricas de polvo al año a la atmósfera global (Perkins 2001; Griffing et al. 2001; Griffin 2007).

En Chile, los remolinos de polvo, son producidos con mayor frecuencia en áreas desérticas donde las superficies son calentadas fuertemente por el sol, y luego de formarse en la superficie, ascienden, como en el caso del Desierto de Atacama, en la zona de Huara, a 30 kilómetros al norte de Pozo Almonte en la I región se han llegado a contar más de 70 remolinos simultáneos (comunicación personal Dr. Aldo Montecinos),

El reciente Panel de evaluación Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) concluye que el polvo podría estar jugando un papel importante en el

forzamiento climático. El IPCC asume que las fuentes naturales de polvo han sido continuas en los últimos cientos de años y todo esto es atribuible a los impactos del uso de la tierra por el hombre, los cuales se estiman que contribuyen en un 20 a 50% del total de las emisiones de polvo hoy en día (Easterling et al. 2000; Burkow y Kallenborn 2000).

La emisión de bioaerosoles puede ocasionar cambios en los ecosistemas globales que afectan tanto a la salud humana como al ambiente. Un ejemplo importante es el observado en el lago Chad donde la prolongada sequía, el pastoreo excesivo, y la desecación han contribuido con las tremendas emisiones de polvo cargado de bioaerosoles desde las regiones africanas del Sahel. Este polvo es transportado por los vientos hacia el Caribe, donde ha sido vinculado con el aumento en las tasas de enfermedades asmáticas en el hombre y la introducción de agentes patógenos sospechosos de ser los causantes de la mortandad de los arrecifes de corales marinos (Garrison et al. 2003).

Un estudio ecológico estimó que aproximadamente un 20% de las especies identificadas en los bioaerosoles movilizados por una tormenta de polvo en Bikaner, India, pueden ser las causantes de enfermedades en plantas y animales y que casi un 10% de ellas son patógenos humanos oportunistas (Griffin 2005).

Se ha demostrado que las nubes de polvo atmosférico sirven como fuentes periódicas de contaminantes, como es el caso de los compuestos orgánicos persistentes (COPs), cuya distribución mundial se ha convertido en uno de los principales problemas ambientales en la última década.

Numerosos investigadores han discutido, revisado y demostrado la existencia del transporte de contaminantes a gran distancia (Oehme 1991; Barrie et al. 1992; Burkow y Kallenborn 2000). Tal es el caso de los COPs, debido a sus propiedades físico-químicas, en especial a su carácter semi-volátil, estos compuestos pueden evaporarse y condensarse con el aumento o disminución de la temperatura (Estellano et al. 2006; Fernandez y Grimalt 2003; Goiun et al. 2004). Estas características permiten a los COPs viajar largas distancias y migrar desde zonas cálidas a regiones frías y la asociación preferencial con partículas de la atmósfera

aumenta su velocidad de eliminación por procesos de depositación seca y húmeda. (Oehme 1991; Fernández, y Grimalt 2003; Arbelli 2009).

En zonas donde predominan las temperaturas frías, la evaporación de estas sustancias es mínima y tienden a redepositarse, acumularse y concentrarse en diferentes matrices ambientales; resultando en una amplia distribución, pudiendo encontrarse en regiones donde nunca fueron usados, como por ejemplo en sitios remotos, en zonas polares y regiones montañosas (Estellano et al. 2006; Jaward et al. 2001; Meakin 2000; Oehme 1991; Barrie et al. 1992; Burkow y Kallenborn 2000; Fernández y Grimalt 2003; Arbelli 2009).

El transporte de aerosoles, que llevan estos compuestos tóxicos, de latitudes bajas a altas se lleva a cabo en pasos sucesivos de condensación /volatilización conocido como el "efecto saltamontes" por el cual estos compuestos se intercambian entre el aire y las superficies terrestres de acuerdo a los cambios de temperatura estacional a latitudes medias (Oehme 1991; Fernández y Grimalt 2003; Mendoza 2008; Arbelli 2009). Resultados de los niveles de PCBs en suelos y sedimentos lacustres en todo Chile mostraron concentraciones mayores a las esperadas en zonas remotas y de altas latitudes con valores totales de PCB de 298 ng/g de peso seco (Mendoza et al. 2006). Se ha observado un aumento significativo en los flujos de depositación de estos compuestos, en los últimos 50 años (Mendoza 2008).

Bacterias transportadas por el aire

Debido a la baja humedad, escasez de nutrientes, temperaturas variables, y a la exposición ultravioleta, la atmósfera se considera un ambiente oligotrófico y difícil y por lo tanto desafiante, no sólo para la supervivencia, sino también para el crecimiento de los microorganismos (Franzetti et al. 2011; Peccia y Hernández 2006). A pesar de esto, las bacterias continúan estando presentes ubicuamente en el aire (Jaenicke 2005) y en concentraciones celulares significativas, en magnitudes de un 10^3 a 10^5 UFC por m^3 de aire aproximadamente (Burrows et al. 2009; Maron et al. 2005). Las comunidades de bacterias aerotransportadas parecen mostrar altas diversidades, comparables con las comunidades presentes en el agua y en el suelo

(Brodie et al. 2007; Maron et al. 2005). Esta contradicción evidente se puede explicar por los diversos mecanismos de adaptación bacterianos tales como tolerancia de la temperatura, mecanismos de reparación del ADN, y otros medios para la protección ultravioleta como introducirse en la profundidad de las partículas o produciendo una amplia gama de pigmentos (Polymenakou 2012; Tong y Lighthart 1997; Womack et al. 2010).

Tringe et al (2008) utilizaron la metasecuenciación de ADN en muestras de aire encontraron genes que indican que no sólo el daño oxidativo y la desecación son los mayores condiciones de stress para la microbiota aerotransportada, como se esperaba, también la disponibilidad del hierro es un factor limitante. Otro mecanismo de protección de las bacterias es iniciar un estado de no división (dormancia), donde se transforman morfológicamente a endosporas o experimentan otras modificaciones de la pared celular (Dewi et al. 2012). Esta es una estrategia típica para las bacterias expuestas a stress tales como escasez de nutrientes, de agua, y fluctuaciones de otros parámetros ambientales (Bär et al. 2002), características muy comunes de la vida en el aire.

Las bacterias también pueden estar en un estado metabólicamente activo en el aire e incluso puede multiplicarse en él. (Amato et al. 2007a; Amato et al. 2007b; Sattler et al 2001). La información sobre el crecimiento y actividad de bacterias aerotransportadas es todavía escasa, porque la atmósfera aún no es considerada, como hábitat para los microorganismos (Morris et al. 2008). Todas estas adaptaciones, y posiblemente muchas más, ayudan a explicar la presencia ubicua de microorganismos en la atmósfera.

Otro aspecto importante es el transporte y dispersión a través de la atmósfera de las bacterias. Algunos estudios han intentado modelar este transporte bacteriano, Nguyen et al. (2006) han intentado predecir brotes de *Legionella pneumophila* usando un modelo de dispersión gaussiano que sirve generalmente para modelar agentes contaminadores desde un determinado punto como fuente Burrows et al. (2009) han modelado el transporte y las concentraciones bacterianas mundiales en bioaerosoles, usando los modelos para la circulación atmosférica, clima, y emisión

por diversas clases de ecosistemas (Figura 1). Concluyeron que su modelo todavía necesita más datos experimentales para superar sus limitaciones, pero que no sólo permite la predicción de concentraciones bacterianas por todo el mundo, sino también tiene aplicaciones interesantes para la biogeografía microbiana al permitir profundizar en la dispersión del material genético entre los ecosistemas.

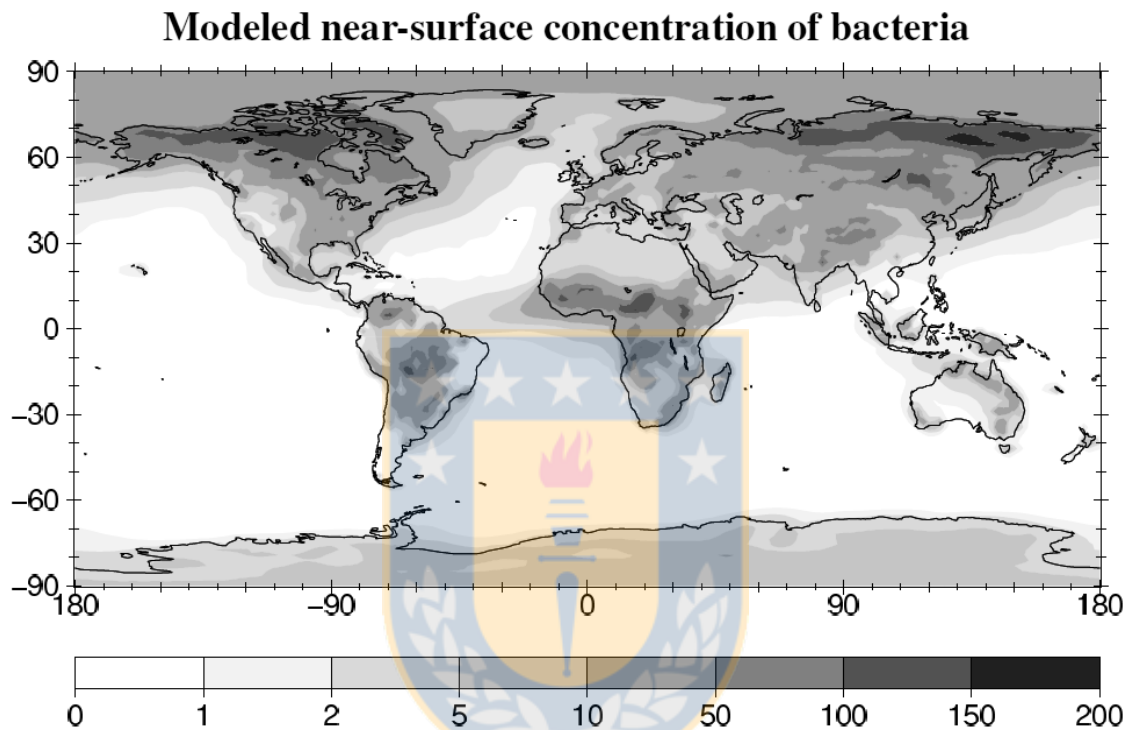


Figura 1: Concentraciones de bacterias en zonas cercanas a la superficie (10^3 m^{-3}) basados en el modelo de Burrows et al (2009).

En este caso se asume que las bacterias son de un tamaño de $1 \mu\text{m}$. Las bacterias más grandes que $1 \mu\text{m}$ se espera que sea transportada cortas distancias (Burrows et al. 2009).

Las bacterias entran a la atmósfera próxima a la superficie del suelo por la aerosolización de diversas superficies tales como plantas, animales (incluyendo humanos), suelo y agua (Figura 2) (Burrows et al. 2009; Jones y Harrison 2004). La aerosolización de bacterias puede ocurrir en bacterias solas o en partículas con bacterias (Jones y Harrison 2004). Las gotitas que contienen microorganismos en el aire emergen desde el agua (Burrows et al. 2009; Woolf 1997). En la phyllosphere

(las superficies de las plantas y de las hojas) es también probablemente una fuente importante de bacterias aerotransportadas, porque es uno de los hábitats microbianos más grandes en la tierra con una superficie altamente expuesta al aire (Redford y Fierer 2009). Además, muchas bacterias aerotransportadas fueron identificadas como especies que también están presentes dentro de comunidades bacterianas del suelo, indicando el suelo como un contribuyente muy probable (Bowers et al. 2012). Aparte de la aerosolización, la multiplicación celular puede contribuir a las concentraciones bacterianas en el aire, aunque no se sabe hasta donde se extiende (Amato et al. 2007b; Morris et al. 2008).

En la figura 2 las fuentes abundantes de bacterias aerosolizadas están marcadas con una flecha ascendente, mientras que la deposición se indica con una flecha hacia abajo. Las bacterias aerotransportadas lo hacen frecuentemente y pueden a menudo estar en un estado metabólicamente activo en las nubes.

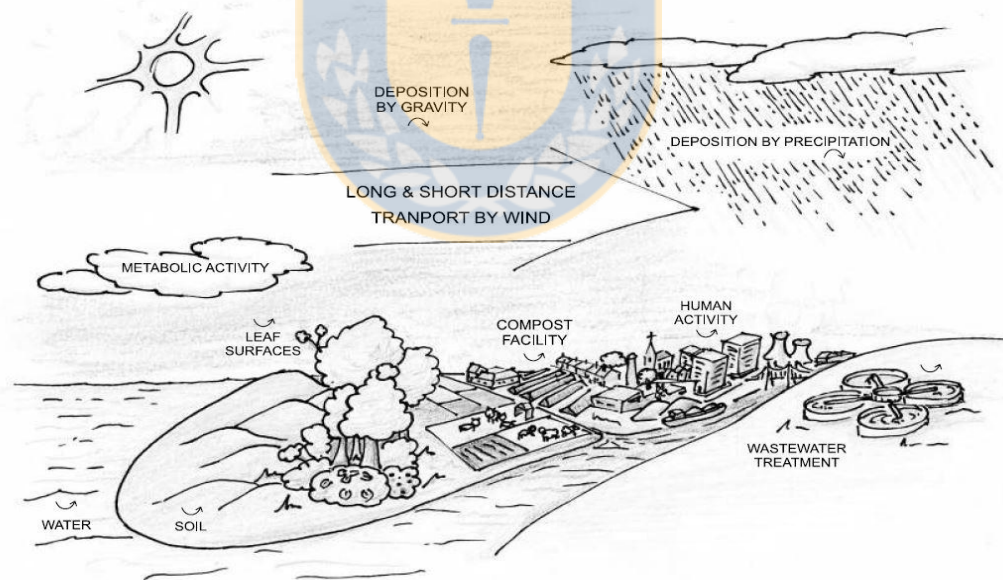


Figura 2. Esquema de los procesos típicos que determinan la composición de las comunidades bacterianas del aire. (Albrecht et al. 2007; Amato et al. 2007a; Amato et al. 2007b; Bowers et al. 2011b; Burrows et al. 2009b; Favet et al. 2013; Grammatika & Zimmerman 2001; Han et al. 2012)

Dispersión y depositación de Bioaerosoles Bacterianos

Los bioaerosoles que entran a la atmósfera pueden formarse por muchas causas: partículas de polvo, lluvia, movimiento del agua en los ríos y mar, en el entorno de sistemas de tratamiento de aguas residuales, aspersores de riego, aire acondicionado o secreciones respiratorias del hombre y de los animales (Tilley 1997; De La Rosa et al. 2002; Griffing 2007). El aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. La presencia de uno u otro tipo depende del origen, de la dirección e intensidad de las corrientes de aire y de la capacidad de supervivencia del microorganismo (Griffing 2007).

La atmósfera es un medio para la dispersión rápida y global de muchos tipos de microorganismos. Además hay una importante transferencia de ellos y de sus metabolitos gaseosos entre la atmósfera, la hidrosfera y la litosfera (Tilley 1997; Griffing 2007; Hervás y Casamayor 2009; Atlas y Bartha 2002).

Muchos microorganismos que viven en la hidrosfera y litosfera pueden encontrarse en el aire, son microorganismos alóctonos, procedentes del suelo, agua y seres vivos que pueblan estos ambientes.

Aunque la atmósfera es una fuente de estrés para los microorganismos del aire debido a la presencia de rayos UV, desecación, temperatura, composición química atmosférica, existen microorganismos capaces de tolerar condiciones extremas, tal es el caso de las bacterias que poseen mecanismos de resistencia a los rayos UV mediante la producción de pigmentos, otras son capaces de resistir la desecación mediante la producción de esporas (Griffing 2007).

Los movimientos del aire y de los seres vivos son los que influyen sobre la presencia de los bacterias en la atmósfera. Junto al suelo hay una capa laminar de aire que impide el fácil paso desde el suelo al aire; para que esto ocurra se necesita una fuerte corriente de aire que levante polvo del suelo o agua y permita así el paso de diversas bacterias (De La Rosa et al. 2002; Griffing 2005; Griffing 2007; Hervás et al. 2009).

Las capas superficiales del desierto están cargadas de diversas comunidades viables de procariotas (Kuske et al. 1997; Papova et al. 2002). Estudios a nivel mundial han

demostrado que, un gramo de suelo contiene aproximadamente 10^7 UFC (en bosque) a 10^9 UFC (en suelos áridos y otros tipos de suelos) (Griffing 2007). Se cree que estas poblaciones están formadas por aproximadamente 10.000 tipos diferentes de bacterias con aproximadamente 0,1% de la población total (Griffing et al. 2001; Griffing 2007). Los estudios que han examinado el número de procariotas cultivables en suelos del desierto han reportado concentraciones que van de 0 a 10^7 UFC/gramo⁻¹ (Maier 2004; Navarro-Gonzalez et al. 2003; Griffing 2007).

Los grupos bacterianos dominantes en suelos, incluyen *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, y *Actinobacteria* (Janssen 2006). Aunque esta composición de la comunidad está determinada por una serie de factores, entre ellos pH, temperatura, composición elemental, y de nutrientes y contenido de humedad, los miembros de otros phyla también están presentes pero con menos frecuencia (Gans et al. 2005; Janssen 2006; Polymenakou et al. 2008).

La dispersión de microorganismos mediante bioaerosoles juega un papel importante en la distribución biogeográfica de especies patogénicas y no patogénicas, actúan como medios de transporte atmosférico a distancias lejanas y se encuentran a concentraciones que varían a través del tiempo debido a cambios climáticos y geológicos (Griffin 2007; Mladenov et al. 2009; Fierer et al. 2008).

Procesos asociados con el cambio global, tales como la desertificación y cambios en el uso de la tierra, están promoviendo un aumento del contenido de polvo en la atmósfera que se ha visto particularmente acentuado en las últimas décadas (Próspero y Lamb 2003; Moulin y Chiapello 2006; Neff et al. 2008).

El consiguiente aumento en la deposición de polvo tiene importantes efectos químicos y biológicos en los ecosistemas acuáticos (Duce y Tindale 1991; Morales-Baquero et al. 2006). Se ha encontrado que la deposición de polvo puede ser una fuente importante de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y otros elementos para los lagos de zonas remotas y se ha demostrado que puede tener un efecto fertilizante sobre la biota de estos lagos (Baron y Caine 2000; Mladenov et al. 2008; Sommaruga y Casamayor 2009; Reche et al. 2009).

Aunque la influencia de los aerosoles, en los ecosistemas acuáticos ha sido tratado, el rol del ingreso de bioaerosoles a ecosistemas de lagos de zonas remotas es un proceso potencialmente importante pero aún muy poco explorado.

El flujo de bacterias aerotransportadas representa una importante vía de colonización de ambientes remotos, como los lagos de la Patagonia. Estos lagos son considerados remotos y prístinos con ecosistemas que carecen de influencia antropogénica local pero con eventos recurrentes de deposición de partículas (aerosoles). Estos ecosistemas responden rápidamente a las perturbaciones ambientales y son indicadores muy sensibles del cambio global (Catalan et al. 2006; Sommaruga y Casamayor 2009) emergiendo como un sistema conveniente para monitorear la dispersión bacteriana. Todo esto se puede ver alterado o modificado, entre otras causas, por el ingreso de nuevas especies de microorganismos provenientes desde lugares lejanos.

Es muy poco lo que se sabe acerca de la migración de microorganismos mediante el fenómeno de dispersión y posterior deposición de bioaerosoles por lo que es importante estudiar las comunidades microbianas y su función en los sedimentos lacustres, ya que así mejoraría la comprensión de estos ecosistemas y como responden frente a la influencia de agentes externos (Ranjard et al. 2000).

Existen sólo algunas observaciones que cuentan con información valiosa para ayudar a comprender los procesos de transporte de bioaerosoles hasta lugares lejanos, debido a dificultades técnicas para observar directamente a los microorganismos en la atmósfera donde el transporte a grandes distancias es muy activo (Iwasaka et al. 2009). La investigación sobre bioaerosoles se ha centrado principalmente en los riesgos que produce a nivel de salud pública basándose en técnicas de detección y recuento de los microorganismos presentes en ellos (Georgakopoulos et al. 2009). En los últimos años se han desarrollado varios métodos de muestreo, y medición de la densidad numérica de bioaerosoles, la forma, propiedades ópticas y de superficie, caracterización química de la materia condensada y semi-volátil e identificación de las partículas biológicas. Sin embargo, no hay una sola técnica capaz de captar plenamente la complejidad física y química

de la materia biológica. Los métodos de caracterización tienen como blanco la célula total o los componentes específicos de ella en una muestra de aire (Georgakopoulos et al. 2009). Los métodos que se dirigen a la célula total involucra examen microscópico, identificación inmunológica, o, en el caso de microorganismos, cultivo en diversos medios nutritivos. Los métodos para detectar los componentes celulares son muy variadas: van dirigidos a los marcadores bioquímicos (proteínas, ácidos grasos, azúcares) o ácidos nucleicos (ADN y ARN) y son a menudo una combinación de diferentes estrategias (Georgakopoulos et al. 2009).

Algunas de las tecnologías que se están desarrollando requieren la introducción de cepas bacterianas especializadas, al medio ambiente (Valo et al. 1990). Pero, las cepas microbianas seleccionadas en el laboratorio, sin embargo, a veces no pueden producir el efecto deseado en los hábitats naturales porque su supervivencia y actividad en el medio ambiente no es la adecuada (McClure et al. 1991; Wagner et al. 1992). Por lo que estudios en microcosmos constituyen un medio importante para la evaluación del funcionamiento de las bacterias aloctonas y su posible influencia en la microflora autóctona (Sayler et al. 1987; Tiedje et al. 1989; Wagner et al. 1992). La presencia de microorganismos alóctonos podría influir o alterar la actividad biológica, la biomasa, producción y remineralización en los sistemas lacustres ya que estas actividades son realizadas principalmente por los microorganismos autóctonos (Lekunberri et al. 2010; Miskin et al. 1998).

Importancia de las bacteria transportadas por el aire

El hecho que los microorganismos, específicamente bacterias puedan ser transportados por el aire es un tema de gran interés sobre todo el rol que tienen en la salud humana, economía, ecosistemas y en el agua (Bowers et al. 2011b; Fierer et al. 2008).

Los patógenos transportados por el aire pueden ser una amenaza para la salud pública. Estos incluyen, principalmente virus, bacterias y hongos.

Numerosos trabajos han demostrado que las nubes de polvo atmosférico no solo sirven como fuentes periódicas de nutrientes e incluso de contaminantes (Arbelli

2009; Fernández y Grimalt 2003) sino también, sirven como un medio para el transporte global, de bioaerosoles que podrían llevar microorganismos patógenos y no patógenos. Estudios microbiológicos de material particulado han demostrado la movilidad de una comunidad bacteriana, a través de la atmósfera en nubes de polvo provenientes de zonas desérticas (Zhang et al. 2003; Washington et al. 2003; Griffin 2007).

Los microorganismos, juegan un rol importante en los ecosistemas lacustres debido a que son los principales responsables de la actividad biológica, la producción de biomasa, y remineralización en los sistemas lacustres, mientras que los organismos pertenecientes a niveles tróficos superiores (peces, crustáceos) juegan un rol menor. Todos estos procesos se pueden ver alterados o modificados, entre otras causas, debido al ingreso de especies de microorganismos aloctonos (Hans et al. 2003; Lekunberri et al. 2010).

Existen escasos estudios relacionados con la migración de microorganismos mediante el fenómeno de dispersión y depositación de bioaerosoles en Chile por lo que es importante estudiar los efectos que puede producir la presencia de microorganismos aloctonos en ecosistemas lacustres, lo que permitiría un mejor conocimiento de la respuesta de dichos ecosistemas frente a la influencia de agentes externos.

El riesgo de la dispersión de microorganismos patógenos o no patógenos hacia zonas remotas puede producir efectos en el ecosistema de lagos patagónicos tales como alteración de los ciclos biogeoquímicos y tramas tróficas y también puede llegar a producir diversas enfermedades a plantas, animales e incluso al hombre (Griffin 2007).

Por lo mencionado anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la potencial viabilidad de bioaerosoles, en sistemas acuáticos remotos en experimentos de microcosmos.

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de bacterias en las muestras de bioaerosoles de zonas remotas, como lo son la zona desértica de Huara y los Lagos de la Patagonia; incluso en este trabajo se logró aislar una cepa inusual para dichos

ambientes. Además se detectó la presencia de resistencia a antibióticos, usados en el ambiente hospitalario, en algunas de las muestras en estudio así como la presencia de plásmidos de amplio rango de hospedador.

En este trabajo también, se demuestra la viabilidad de los bioaerosoles en zonas remotas, lo que implicaría que las bacterias que viajan en dichos bioaerosoles pueden hacerlo por largas distancias, llevando consigo genes como los de resistencia a antibióticos y llegar hasta zonas remotas ocasionando alteraciones y daño al ecosistema y también al hombre. En Chile, no existe información al respecto, de manera que los resultados obtenidos son pioneros en nuestro país y pueden servir como línea base para estudios posteriores.



CAPITULO II



1. HIPOTESIS

La emisión de aerosoles, entre ellos los bioaerosoles, a la atmósfera es un fenómeno creciente a escala global que transporta y dispersa a miles de kilómetros partículas, nutrientes, contaminantes, y microorganismos. En los últimos años, la generación de estos aerosoles atmosféricos está en aumento por efectos producidos por el cambio climático.

Estudios recientes indican que los microorganismos pueden desplazarse a miles de km en la atmósfera alta suspendidos en partículas de polvo y ser transportados por el viento y llegar hasta zonas remotas.

La magnitud de los fenómenos de dispersión y depositación y las consecuencias sobre el ecosistema lacustre se pueden poner de manifiesto en fenómenos tales como alteración de la estructura de comunidades microbianas autóctonas, aparición de plagas y enfermedades en fauna y flora de ecosistemas acuáticos no adaptadas a especies microbianas colonizadoras.

Estos antecedentes permiten postular la siguiente hipótesis:

Hipótesis

Los bioaerosoles, del desierto de Atacama, transportan bacterias potencialmente patógenas, que pueden adaptarse a las condiciones de lagos Patagónicos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar la potencial viabilidad de bioaerosoles, en sistemas acuáticos remotos en experimentos de microcosmos.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de microorganismos en bioaerosoles desde ambientes remotos.
2. Caracterizar las bacterias aisladas desde bioaerosoles de zonas remotas.
3. Determinar la viabilidad de las bacterias transportadas por bioaerosoles, en experimentos de microcosmos.



CAPITULO III

DETECCIÓN DE BACTERIAS DESDE BIOAEROSOLES DE ZONAS REMOTAS



Guisella Escalante ^{1,2}; Carla G León ¹; Víctor Guzmán ¹; Roberto Urrutia ²; Víctor L Campos ^{1*}, María Angélica Mondaca¹. Detección de bacterias cultivables desde bioaerosoles de zonas remotas de Chile. Aerobiología (En preparación)

Detección de bacterias desde bioaerosoles de zonas remotas de Chile.

Guisella Escalante ^{1,2}; Carla G León ¹; Victor Guzmán ¹; Roberto Urrutia ²; Víctor L Campos ^{1*}, María Angélica Mondaca¹;

(1) Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Casilla Postal.160-C, Correo 3, Concepcion, Chile.

(2) Centro EULA-CHILE, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

*Autor para correspondencia: guiescalante@udec.cl, Phone +56 41 2204118.

Resumen

Los movimientos del aire y de los seres vivos son los que sitúan a los microorganismos en la atmósfera. La dispersión de microorganismos por el polvo juega un papel importante en la distribución biogeográfica de especies patogénicas y no patogénicas, como rutas de transporte atmosférico a largas distancias y concentraciones que varían a través del tiempo debido a cambios climáticos y geológicos. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de bacterias en muestras de bioaerosoles de zonas remotas de Chile, para lo cual se tomaron muestras desde tres lagos de la Patagonia y una muestra desde la zona desértica de Huara. Las muestras fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido, se realizó recuento de células totales y aislamiento e identificación de células viables. De acuerdo a los resultados se demostró la presencia de bacterias en las muestras de bioaerosoles de los Lagos Patagónicos y de Huara. Se observa que existe diferencia en cuanto a la forma y afinidad tintorial de los microorganismos. La relación entre Gram (+) y Gram (-) es variable en las diferentes muestras, predominando las bacterias Gram negativas. Este es el primer estudio que demuestra la presencia de bacterias viables y cultivables en bioaerosoles de zonas remotas de Chile.

Palabras claves

Bioaerosoles – Desierto de Atacama- Lagos patagónicos – Bacterias transportadas por el aire

Introducción

El material particulado con un diámetro entre 0.1 y 10 μm son un foco importante de interés y estudio ya que de acuerdo a la literatura pueden afectar la reflexión y dispersión de la luz solar incidente, la nubosidad local y precipitación además pueden permanecer en la atmósfera durante mucho tiempo y, en consecuencia, pueden ser transportadas a grandes distancias. (Tolgyessy 1993; De la Rosa et al. 2002; Joksic et al. 2009)

El material particulado de dicho diámetro contiene virus, bacterias, esporas, polen o en general cualquier resto de microorganismos y se denomina Bioaerosol, tienen un diámetro aerodinámico comprendido entre 0.5 y 100 μm (Cox y Wathes 1995; Georgakopoulos D.G. et al. 2009). Los bioaerosoles incluyen una amplia gama de materia orgánica con alto grado de variabilidad en sus características físicas y químicas tales como tamaño, forma, estado, composición, etc. Los bioaerosoles forman una parte importante de los aerosoles atmosféricos, incluso alcanzando a veces hasta cerca del 50% de todas las partículas de aerosol (Jaenicke 2005).

Muchos microorganismos que viven en la hidrosfera y litosfera pueden encontrarse en el aire. Son microbios alóctonos, procedentes del suelo, agua y seres vivos que pueblan estos ambientes. Los movimientos del aire y de los seres vivos son los que sitúan a los microorganismos en la atmósfera (De La Rosa et al. 2002; Griffing 2007).

Desde el punto de vista de la aerodinámica se cree que los bioaerosoles son fácilmente transportados a grandes distancias lejanas de su origen a través de diversos procesos dinámicos aéreos y que son ubicuos en la atmósfera de la Tierra, especialmente en la atmósfera inferior. Por lo que se sugiere, que esas partículas pueden influir en el medio ambiente, clima, salud pública, y otros, a escala regional

y/o mundial (Griffin et al. 2001; Próspero et al. 2005; Ariya y Amyot 2004; Lohmann y Feichter 2005; Kanakidou et al. 2005; Sun y Ariya 2006; Fuzzi et al. 2006; Elbert et al. 2007; Möhler et al. 2007). Estudios recientes destacan el papel que cumplen las bacterias presentes en ambientes polares o montañosos y sugieren la importancia de mayores estudios sobre el transporte atmosférico a larga distancia de la microbiota (Skidmore et al. 2000; Amato et al. 2007; Zhang et al. 2007).

Sin embargo, existen sólo algunas observaciones que cuentan con información valiosa para ayudar a comprender los procesos de transporte de los microorganismos hasta lugares lejanos, debido a dificultades técnicas para observar directamente a los microorganismos en la atmósfera, especialmente en la atmósfera libre, donde el transporte de largo alcance de componentes atmosféricos es muy activo. Griffin et al. (2001) y Kellogg y Griffin (2006), hicieron mediciones en base a muestreos de partículas de tierra durante eventos de polvo y del análisis de datos satelitales, ambos muestran que los bioaerosoles pueden encontrarse frecuentemente en otros tipos de aerosoles como polvo, espuma del mar, entre otros, y así son transportados a largas distancias en la atmósfera.

Los microorganismos dispersados en el aire tienen una considerable importancia biológica y económica. Numerosas enfermedades de plantas son causadas por hongos y algunas por virus y bacterias que se transmiten por el aire, produciendo graves pérdidas en las cosechas (Waggoner 1983). Varias enfermedades víricas, bacterianas y fúngicas del hombre y los animales, se transmiten por la atmósfera y a menudo se producen brotes epidémicos. Los microorganismos presentes en el aire también pueden contaminar los alimentos y materiales orgánicos (cuero, textiles, papel) produciendo su alteración (De La Rosa et al. 2002).

Los microorganismos del polvo pueden impactar directamente en la salud humana produciendo enfermedades o el desarrollo de estas (ej. el asma) a través de una exposición prolongada. La dispersión de microorganismos por el polvo juega un papel importante en la distribución biogeográfica de especies patogénicas y no patogénicas, como rutas de transporte atmosférico a largas distancias y

concentraciones que varían a través del tiempo debido a cambios climáticos y geológicos (Griffin 2007; Mladenov et al. 2008; Fierer et al. 2008).

Por lo señalado el objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de bacterias en muestras de bioaerosoles tomadas desde zonas remotas de Chile

Materiales y Métodos

Zonas de Muestreo

Las muestras se tomaron en el desierto de Atacama en la zona de Huara ($19^{\circ}59'25.6''\text{S}$ $069^{\circ}44'24.5''\text{W}$), a 30 kilómetros al norte de Pozo Almonte (I región de Chile) y desde los lagos ubicados en la Patagonia.

Los lagos, a estudiar fueron: Alto ($46^{\circ}11'17.34''\text{S}$ $72^{\circ}19'45.04''\text{O}$), Verde ($46^{\circ}9'35.83''\text{S}$ $72^{\circ}19'8.58''\text{O}$) y Esponja ($45^{\circ}9'53.2794''\text{S}$ $72^{\circ}8'43.7994''\text{O}$), cerca a la ciudad de Coyhaique, región de Aysén, Chile.

Muestras de bioaerosoles

Los bioaerosoles, se obtuvieron utilizando la técnica de filtrado simple para coleccionar pequeñas partículas en suspensión. El equipo colector, colocado a una altura mayor a 2.5 metros, constó básicamente de una bomba de vacío portátil (Tactical Air Sampler) con un flujo de aire de 5 litros por minuto, un medidor de volumen y una cámara que lleva una membrana filtrante de nitrocelulosa de 47mm de diámetro y tamaño de poro de $0.2\ \mu\text{m}$ aproximadamente. (Britch 1998). El colector de aire funcionó continuamente durante 24 horas y los filtros de membrana fueron reemplazados cada 6 horas aproximadamente. Las partículas en suspensión que inciden sobre el filtro quedan atrapadas en estos poros formando un depósito. Los filtros de membrana, que contienen las muestras de bioaerosoles, fueron retirados de la bomba de vacío, y colocados en bolsas estériles y refrigerados para su posterior análisis. Se utilizó como control un filtro de membrana adicional que se colocó en la bomba de vacío y se dejó reposar sin quitar la tapa ni encender la bomba.

Microscopía Electrónica de Barrido

Con el objetivo de observar la presencia de bacterias retenidas en los filtros de nitrocelulosa, trozos de estos filtros fueron fijados con glutaraldehído al 3% y enviados al laboratorio de Microscopía Electrónica de la Dirección de Investigación, de la Universidad de Concepción. El análisis se realizó mediante microscopio electrónico de barrido JEOL, modelo JSM-638 OLV. (Escalante et al 2014)

Aislamiento e Identificación de células viables

Un trozo de cada uno de los filtros a ser analizado, fue colocado sobre la superficie de una placa con agar R2A (Griffin et al. 2001). Las muestras fueron incubadas a 25°C durante 48 horas. Las colonias desarrolladas en la superficie del filtro fueron aisladas y posteriormente cultivadas, durante toda una noche, en caldo R2A. Un ml del cultivo fue transferido a un tubo de cepario con 200 µl de glicerol estéril. Estos cepas aisladas fueron mantenidos a -70 °C para su posterior identificación.

Las cepas aisladas fueron identificadas de acuerdo a sus propiedades bioquímicas utilizando el sistema RapID™ One (Remel. INC) y RapID™ NF PLUS (Remel. INC) de acuerdo a la recomendación de los proveedores.

Recuento de células totales

Para conocer el número total de bacterias presentes en los filtros, un trozo del filtro se lavó con solución salina. Un mililitro de cada una de las soluciones de lavado de los filtros de membrana se fijó con una solución de formalina a una concentración final de 1%. Las muestras se tiñeron con naranja de acridina a una concentración final de 0,5 mg/mL durante 25 min y luego se filtró a través de una membrana de 0,2 micras. El recuento se realizó en triplicado, usando un microscopio de epifluorescencia (Iwasaka et al. 2009).

Resultados y Discusión

Las muestras de bioaerosoles desde las dos zonas de estudio (Huara y Patagonia) fueron tomadas mediante la técnica de filtración en discos de membrana de nitrocelulosa de acuerdo a lo indicado en la metodología de este trabajo. Las muestras fueron analizadas mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), se observaron formas bacterianas bacilares y cocáceas adheridas a los filtros (Fig. 1a, 1b, 1c, 1d, 1e). Los filtros de membrana usados como controles no mostraron presencia de microorganismos al ser observados bajo MEB.

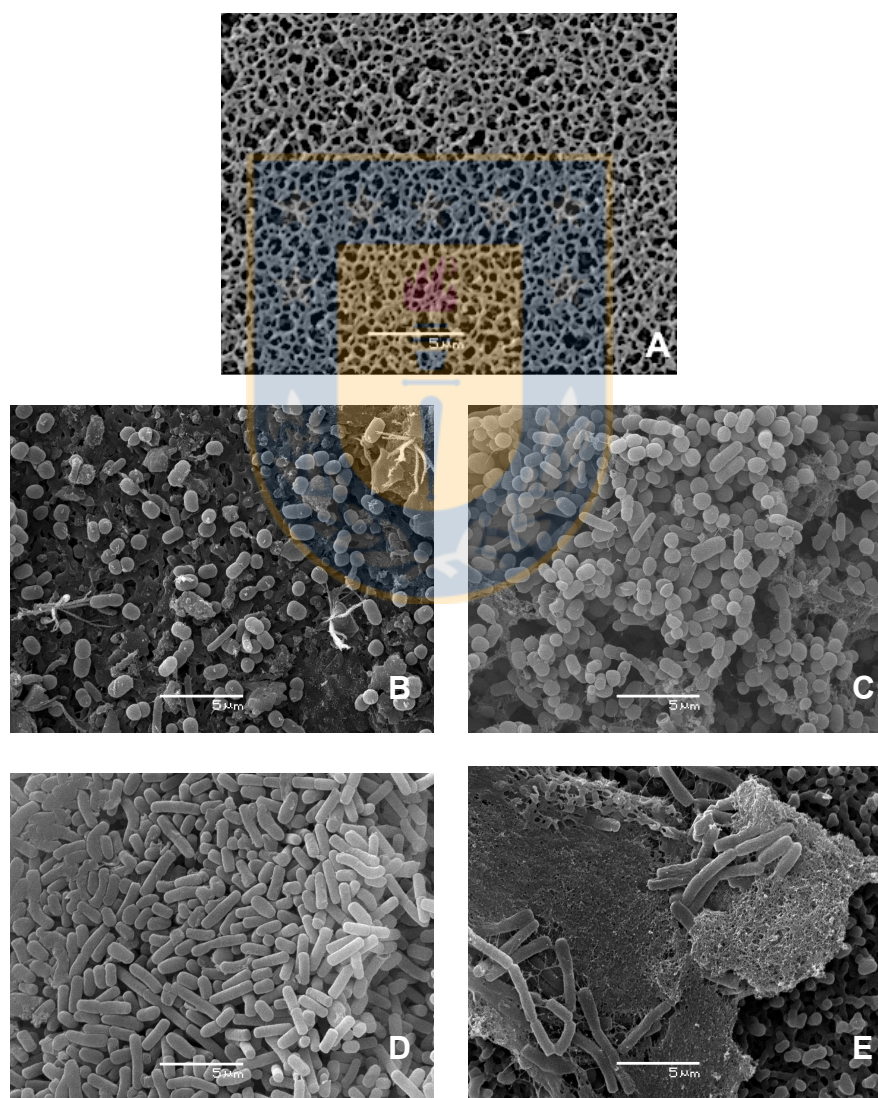


Fig. 1 Microscopia electronica de barrido (MEB) de bioaerosoles atrapados en filtros de membrana de nitrocelulosa en lagos de la Patagonia Chilena; A: Control; B:Lago Alto; C: Lago Verde; D: Lago Esponja; E: zona desértica de Huara

Los resultados del recuento total de células muestran que en los bioaerosoles tanto de agua de los lagos Patagónicos como del desierto, hubo crecimiento bacteriano (Fig.2). Esto coincide con lo informado por trabajos anteriores donde se señala que el aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. La presencia de uno u otro tipo depende del origen, de la dirección e intensidad de las corrientes de aire y de la supervivencia del microorganismo.

Las bacterias presentes en los bioaerosoles pueden ser viables o no viables, las primeras son capaces de reproducirse o tienen actividad metabólica y las segundas, no son capaces de multiplicarse o están muertas. Para que las células sean infecciosas, tienen que ser viables. Sin embargo, tanto las células viables como las no viables pueden originar reacciones alérgicas o efectos tóxicos (Dietrich 2009).

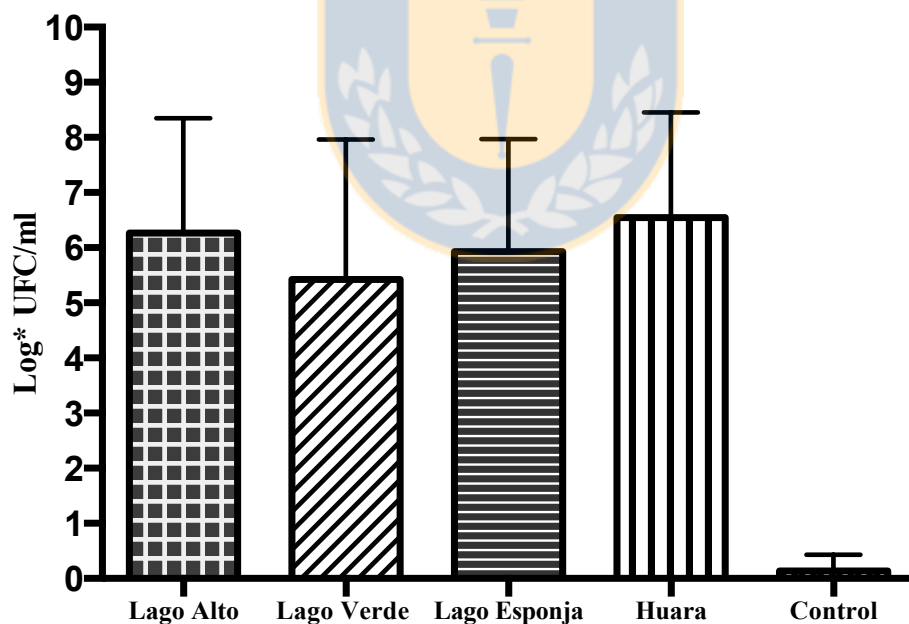


Fig. 2. Recuento total de células presentes en muestras de bioaerosoles de tres Lagos Patagónicos y de la zona desértica de Huara

Las bacterias se clasifican en función de las características celulares, morfológicas o bioquímicas y se dividen en dos grandes grupos en función de su reacción a la tinción de Gram: bacterias Gram positivas y Gram negativas. En cuanto a la forma bacteriana y afinidad tintorial se puede observar en la Figura 3. que la proporción de bacterias con forma bacilar y cocacea es muy similar y también son muy frecuentes los cocobacilos.

Además se observa que la mayoría de las bacterias de las muestras de bioaerosoles fueron Gram negativas, lo que no concuerda con muchos autores quienes señalan que es más frecuente aislar Gram positivos (Fig. 4), ya que los bacilos Gram negativos se encuentran en menor proporción y disminuyen con la altura debido a que tienen una pared celular frágil que no tolera bien la deshidratación cuando se someten a la exposición al aire durante períodos prolongados o durante el muestreo. Las bacterias Gram positivas tienen una pared más resistente y algunas producen esporas que les dan una mayor resistencia a las variaciones en las condiciones ambientales. (Goyer et al. 2001).

El problema de que las bacterias transportadas sean Gram negativas radica en la presencia de las endotoxinas, que son toxinas presentes ya sea en la célula bacteriana o en los fragmentos de las paredes de las células liberadas durante la lisis bacteriana (Goyer et al. 2001). Las endotoxinas son pirógenos y tienen propiedades tóxicas y proinflamatorias y están presentes en muchos entornos incluido el medio ambiente (Eduard et al. 2008; Martinez et al. 2004).

Los resultados obtenidos mediante la identificación de propiedades bioquímicas utilizando el sistema Rapid One y NF plus se observa la presencia de diversas bacterias (Tabla 1) algunas de las cuales han sido previamente aisladas por otros autores (Jones y Harrison 2004; Lighthart y Shaffer 1994; Sarica et al. 2002; Beggs et al. 2008). Como se puede observar en dicha tabla la bacteria aislada con más frecuencia fue *Acinetobacter*, esta bacteria es una bacteria aislada frecuentemente en muestras de aire y agrupa bacterias oportunistas altamente patógenas y resistentes para el hombre (Bergogne-Berezin y Towner 1996).

De acuerdo a los resultados se demuestra la presencia de bacterias en las muestras de bioaerosoles de los Lagos Patagónicos y de la zona desértica de Huara, estas bacterias aisladas fueron diferentes entre si en cuanto a la forma y afinidad tintorial. Se debe señalar que este es el primer estudio que demuestra la presencia de bacterias totales y cultivables en bioaerosoles de zonas remotas de Chile.

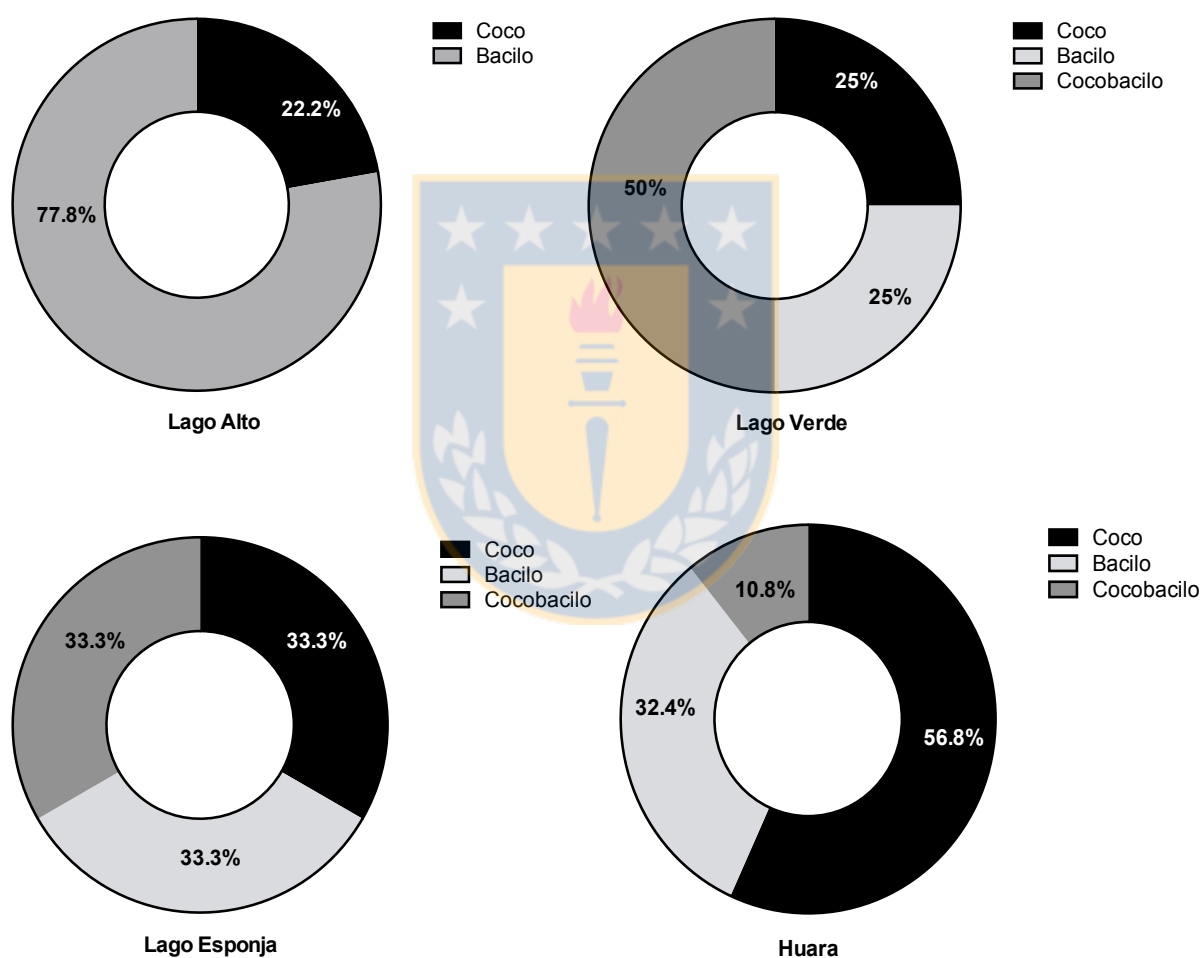


Fig. 3. Porcentaje de Bacterias de forma cocacea, bacilar y cocbacilar presentes en las muestras de bioaerosoles de lagos Patagónicos y de la zona desértica de Huara

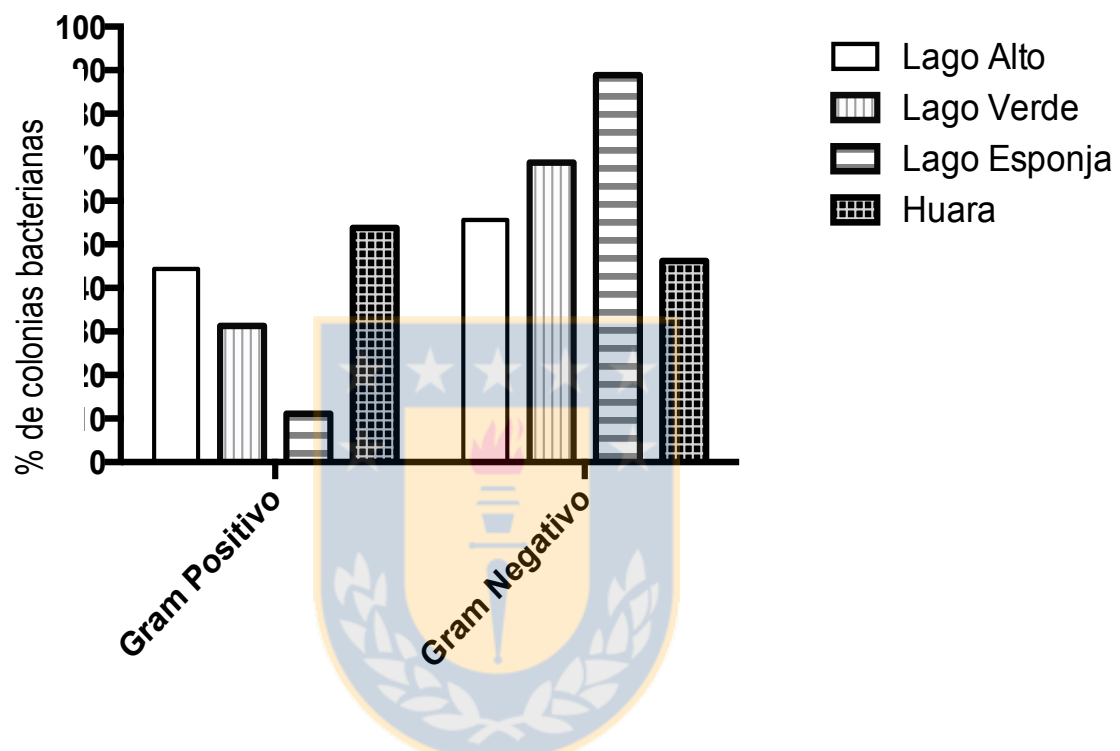


Fig. 4. Porcentaje de Bacterias Gram positivas y Gram negativas presentes en las muestras de bioaerosoles de lagos Patagónicos y de la zona desértica de Huara

Tabla 1. Identificación bioquímica de bacterias desde bioaerosoles de la zona de lagos Patagónicos y la zona de Huara

Muestras	Genero /Especie
Lago Alto	<i>Edwardsiella tarda</i> <i>Acinetobacter</i> (6) <i>Alcaligenes piechaudii</i> CDC NO-1 <i>Acinetobacter</i>
Lago Verde	<i>Acinetobacter</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (3) <i>Pseudomonas</i> CDC NO-1 <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Moraxella osloensis</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Acinetobacter</i>
Lago Esponja	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Moraxella osloensis</i> (2) <i>Acinetobacter</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (2) <i>Pseudomonas</i>
Huara	<i>Pseudomonas</i> (6) <i>Bacillus</i> (2) <i>Acinetobacter</i> (5) <i>Moraxella</i>

Referencias

Ariya, P.A. & Amyot, M. (2004). Bioaerosols: Impact on physics and chemistry of the atmosphere. *Atmospheric Environment*, 38(8), 1231-1233.

Beggs, C.B., Kerr, K.G., Noakes, C.J., Hathway, E.A, Sleigh, P.A. (2008) The ventilation of multiple-bed hospital wards: review and analysis. *American Journal of Infection Control*, 36, 250-259.

Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*. Apr; 9(2):148-65.

Cox, C.S., Wathes, C.M. (1995). *Bioaerosols Handbook*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

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

Eduard, W., Douwes, J., Thorne, P. S. (2008). *Bioaerosols*. Bioaerosols Elsevier, 287-297.

Elbert, W., Taylor, P.E, Andreae, M.O., Pöschl, U. (2007) Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharge spores, carbohydrates, and inorganic ions. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7:4569–4588.

Fierer, N., Liu, Z., Rodríguez-Hernandez, M., Knight, R., Henn, M, Hernandez, M. (2008). Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 200–207 Vol. 74, No. 1.

Fuzzi, S., Andreae, M.O., Huebert, B.J., Kulmala, M., Bond TC., Boy, M., Doherty, S.J., Guenther, A., Kanakidou, M., Kawamura, K., Kerminen, V.M., Lohmann, U., Russell, L.M., Pösch, I U. (2006). Critical assessment of the current state of scientific knowledge, terminology, and research needs concerning the role of organic aerosols in the atmosphere, climate, and global change. *Atmospheric Chemistry and Physics* 6, 2017-2038.

Georgakopoulos, D., Després, V., Fröhlich-Nowoisky, R., Psenner, R., Ariya, PA., Pósfai, MP., Ahern, HE., Moffett, BF., Hill, T.C.J. (2009). Microbiology and atmospheric processes: biological, physical and chemical characterization of aerosol particles *Biogeosciences*, 6, 721–737.

Goyer, N., Levoie, J., Lazure, L., Marchand, G. (2001). *Bioaerosols in the Workplace: Evaluation, Control and Prevention Guide. Études et Reserches.*

Griffin, D.W. (2007). Atmospheric Movement of Microorganisms in Clouds of Desert Dust and Implications for Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, July, 459–477, Vol. 20, No. 3.

Griffin, D.W., Garrison, V.H., Herman, J.R., Shinn, E.A. (2001) African desert dust in the Caribbean atmosphere: microbiology and public health. *Aerobiologia*, 17 (3), 203–213.

Jaenicke, R. (2005). Abundance of Cellular Material and Proteins in the Atmosphere. *Science* 308: 73.

Joksić, J.D., Jovašević-Stojanović, M., Bartonova, A., Radenković, M.B., Yttri, K.E., Matić-Besarabić, S., Ignjatović, L. (2009) *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74, 11, 1319-1333

Jones, A.M., Harrison, R.M. (2004) The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations a review. *Science Total Environmental*, 326, 151–180.

Kanakidou, M., Seinfeld, J.H., Pandis, S.N., Barnes, I., Dentener, F.J., Nielsen, C.J., Swietlicki, E., Putaud, J.P., Balkanski, Y., Fuzzi, S., Horth, J., Mootgat, G.K., Winterhalter, R., Myhre, C.E.L., Tsigaridis, K., Vignati, E., Stephanou, E.G., Wilson J. (2005). Organic aerosol and global climate modeling: a review. *Atmospheric Chemistry and Physics* 5:1053–1123.

Kellogg, C.A., Griffin, D.W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology and Evolution*. 21, 638.

Lighthart, B., Shaffer, B.T. (1994) Bacterial flux from chaparral into the atmosphere in mid-summer at a high desert location. *Atmospheric Environmental*, 28, 1267–1274.

Lohmann U. y Feichter J. (2005) Global indirect aerosol effects: a review. *Atmospheric Chemistry and Physics* 5:715–735.

Martinez, K., Rao, C., Burton, N. (2004). Exposure assessment and analysis for

biological agents. Grana - Taylor & Francis, 193-208.

Mladenov, N., Pulido-Villena, E., Morales-Baquero, R., Ortega-Retuerta, E., Sommaruga, R. Reche, I. (2008). Spatio-temporal drivers of dissolved organic matter in high mountain lakes: the role of Saharan dust inputs and bacterial activity. *Journal of Geophysical Research* (special section on high mountain lakes), 113.

Möhler, O., Demott, P.J., Vali, G., Levin, Z. (2007). Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences* 4:1059–1071.

Prospero, J.M., Blades, E., Mathison, G., Naidu, R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, 1, 1–19.

Sarica, S., Asan, A., Otkun, M.T., Ture, M. (2002) Monitoring indoor airborne fungi and bacteria in the different areas of Trakya University Hospital, Edirne, Turkey. *Indoor and built Environment*, 11, 285–292.

Sun, J. y Ariya, P.A. (2006). Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review. *Atmospheric Environment*. 40, 795.

Tolgyessy, J. (1993). Chemistry and Biology of water, air and soil. *Environmental Aspects*. Scientific editor. 831p.

Walter, J. 2011. Size Distribution Characteristics of Aerosols. *Aerosol Measurement*, 41-54.

CAPITULO IV

UNUSUAL PATHOGENIC BACTERIUM ISOLATED FROM MICROBIAL COMMUNITIES OF BIOAEROSOLS AT CHILEAN PATAGONIAN LAKES



Guisella Escalante ^{1,2}; Carla G León ¹; Benner Giacomozzi ¹; Victor Guzmán ¹; María Angélica Mondaca¹ ; Roberto Urrutia ²; Carlos Smith ¹; Víctor L Campos ^{1*} . Unusual pathogenic bacterium isolated from microbial communities of bioaerosols at chilean Patagonian lakes. *Aerobiologia*, September 2014, Volume 30, Issue 3, pp 323-331

Unusual pathogenic bacterium isolated from microbial communities of bioaerosols at Chilean Patagonian lakes

Guisella Escalante ^{1,2}; Carla G León ¹; Benner Giacomozzi ¹; Victor Guzmán ¹; María Angélica Mondaca ¹; Roberto Urrutia ²; Carlos Smith ¹; Víctor L Campos ^{1*}

(1) Microbiology Department, Biological Science Faculty, University of Concepción, P.O. Box 160-C, Mail 3, Concepcion, Chile.

(2) EULA-CHILE Center, University of Concepción, Concepción, Chile

*Corresponding author: vcampos@udec.cl, Phone +56 41 2204118.

Abstract

Bioaerosols are transported from warm regions and lower latitudes of the planet to colder regions and higher latitudes, such as the Chilean Patagonia. The role of bioaerosols deposition into remote lake ecosystems is a potentially important process but it has not yet been fully studied. The aim of this study was to detect and characterize potentially pathogenic viable microorganisms in bioaerosols in a pristine area. Samples were collected from the air, at three remote lakes in the Chilean Patagonia, using a sterile filtration system equipped with 0.2 mm pore size nitrocellulose filters. The bacterial community present in bioaerosols was studied using scanning electron microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. Isolates were identified and characterized for phenotypic and 16S rDNA analysis and antibiotic resistance. Scanning electron microscopy observations of samples from each lake showed the presence of bacteria with different morphologies and, after culturing, the identification results revealed that they were strains of *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Moraxella*, *Sphingomonas* and CDC NO-1. CDC NO-1, uncommonly isolated worldwide, stands out from the rest of the isolates because it is a rarely found bacterium so far associated with dog and cat bites, was found at two out of three pristine lakes studied (Alto and Verde). This work

demonstrates, for the first time, the presence of CDC NO-1, a clinically important Gram negative microorganism, in bioaerosols and first report of CDC-NO1 isolation in Chile. Besides its presence in remote lakes, its antibiotic resistance is worth mentioning.

Keywords

Bioaerosols - Patagonian lakes – CDC NO-1 – Air microbiota

Introduction

The air that we breathe not only contains nitrogen, oxygen and carbon dioxide but also traces of other gases, inorganic particles and other particles including elements of biological origin (Lacey et al. 2006). The latter are termed bioaerosols and a large part of them are microorganisms that colonize soil, water bodies, plant surfaces, rocks or are present in association to desert dust storms. These bioaerosols are readily incorporated into the air by wind, erosion and splashing water (Bauer et al. 2002; Griffin et al. 2003; Douwes et al. 2003; Griffin 2004; Stetzenbach et al. 2004; Echigo et al. 2005; Prospero et al. 2005; Kuske 2006; Griffin et al. 2006; Brodie et al. 2007).

In the air, microorganisms become attached to environmental particles or are incorporated into water droplets of clouds, fog, and precipitation (i.e., rain, snow, hail) while they are being transported, sometimes to long distances, by advection processes (Bauer et al. 2002; Sattler et al. 2001). In turn, air microbiota can be deposited back to the earth's surfaces via dry and wet deposition processes. Viable microorganism present in bioaerosols can possibly affect the diversity and function of aquatic and terrestrial ecosystems in which they are deposited (Jones et al. 2008). It can even negatively impact human health, if microbial pathogens are included in these bioaerosols (Morales-Baquero et al. 2006).

Due to their small size, microbes can be transported by upper air currents over long distances, within or among continents, and thus they are able to travel and be

deposited into the most distant areas of the world. In these terms, the movement of air masses serves as the primary mechanism for the rapid conveyance of microorganisms among widely distant habitats (Smith et al. 2012; Isard et al. 2001; Prospero et al. 2005).

Dowd and Maier (2000) have shown that, in general, microorganisms present in most bioaerosols have limited ability to survive when they are suspended in the atmosphere. Hence, it is important to assess the viability of an airborne microorganism to determine its specific potential to act as a human pathogen (Polymenakou 2012; Haas et al. 1999). Cox (1995) has emphasized that the ability of a bioaerosol to spread diseases is dependent on their viability and infectivity following take-off from their original source. In this context, Gram-negative bacteria survive better at low relative humidity and Gram-positive bacteria, such as *Actinomyces*, survive better at high relative humidity (Tang 2009). The long-range mobilization of bioaerosols has increased in recent years due to the effects of climate change (Moulin and Chiapello 2006; Neff et al. 2008).

To date, most of the studies dealing with the presence of microbes in the atmosphere were devoted to the investigation of possible links between dust-related aerosol dispersal with the transportation of potential pathogens. These studies represent significant starting points in the effort to understand the composition and viability of potential pathogens in outdoor air and to assess their negative impact on ecosystem and public health on a global scale. Recently, this issue raised special concern due to the close link between climate change and bacterial aerial dispersal. More specifically, the increase of desertification during the last decade has resulted in a concomitant increase of atmospheric particulates, whereas a connection between El Nino weather events and increased flux of Saharan dust across the Atlantic has also been observed (Prospero et al. 2005; Brodie et al. 2007; Moulin et al. 2006). These effects from climate change may also induce an increase in the dispersal of airborne pathogens.

Most of the Chilean Patagonia is generally considered as remote and pristine due to the scarce local anthropogenic influence. Recent reports have hypothesized that

certain geographic areas (e.g. alpine and cold areas) could act as contaminant convergence zones due to their natural characteristics, allowing a selective trap of anthropogenic pollutants transported by the air (Grimalt et al. 2001, Vighi 2006). Due to their peculiar geographic features, Patagonian lakes in Southern Chile could be considered as a convergence zone in the southern hemisphere allowing them to be considered, therefore, as selective traps. Thus, it is possible that bioaerosols present in the Patagonia might exhibit a mixture of regional and long range transported microorganisms. The study of bioaerosols of the Patagonia is relevant because, besides providing information from an infrequently studied region, it is an ecologically important area. In addition, these ecosystems respond rapidly to remote environmental perturbations and are a sensitive indicator of global changes (Catalan et al. 2006), emerging as a convenient model system for monitoring global-scale bacterial dispersion.

In Chile, there are few studies pertaining to bioaerosols, making this work an important contribution to comprehend their impact on pristine Chilean Patagonian lakes. Therefore, our aim was to detect and characterize microorganisms isolated from bioaerosols at remote lakes of the Chilean Patagonia.

Material and Methods

Sampling

Samples were collected at three lakes: Alto (46 ° 11 '17.34 "S 72 ° 19' 45.04" W), Verde (46 ° 9 '35.83 "S 72 ° 19' 8.58" W) and Esponja (45 ° 9 '53.2794 "S 72 ° 8' 43.7994" W), located near the city of Coyhaique, Aysen region, Chile. In each lake, bioaerosol samples were obtained by a simple filtering technique using a sterile nitrocellulose filter (47mm in diameter; 0.2 µm pore size) at 4,5 meters above water level, using a MiniVol Tactical Air Sampler (Airmetrics). The air sampler operated continuously during 24 h (with a short intermission at 12 hours for replacing the batteries) with a flow of 5 liters per minute (Birch 1998). Filter membranes were replaced every 6 hours. No sampling personnel or other human activity was near the

sampling area while samples were collected. Membranes were aseptically removed from the filtration equipment and placed in sterile bags, sealed with tape and refrigerated (4°C) for later analysis. Additional sterile membranes were used as control, they been placed on the vacuum pump and left without removing the cover or switching on the pump.

Scanning electron microscopy (SEM)

To observe the bacteria retained on the nitrocellulose filters by scanning electron microscopy (SEM), samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in saline solution, according to Campos et al (2011). Then, samples were washed thrice with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) and layered onto polylysine coated cover slips. Fixation was done using modified Karnovsky's fixative (2% paraformaldehyde and 3% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4). Cells were again washed with PBS and distilled water. Fixed cells were dehydrated through a series of ethyl alcohol (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) and finally layered with t-butyl alcohol for freeze-drying and sputter coating. Samples were visualized under a JEOL JSM 6380LV SEM.

Total DNA extraction, PCR and DGGE of the bioaerosol samples

Pieces of filters were used for the extraction of the total DNA contained in the bioaerosol samples. DNA (of each sample) was extracted using the UltraClean soil DNA extraction kit (MO BIO Laboratories). Subsequently, the extracted DNA was used as template for PCR amplification. Universal primers Eub9-27F (GAGTTTGATCCTGGCTCAG) and Eub1542R (AGAAAGGAGGTGATCCAGCC) were used to amplify the 16S rDNA of eubacteria (Brosius et al. 1978). The conditions for the reactions were performed according to Campos et al (2011).

For DGGE analysis, PCR products were used as template for amplification with specific primers for the V3 region of rDNA (p1-GC clamp (341f) 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCG-3'-GC (40 pb) and p2 (534r) 5'-ATTACCGCGGCTGG-3'). PCR products were separated according to Ferris et al

(1996). The gels contained 8% acrylamide (Bio-Rad Laboratories Inc.) and 40-70% urea/formamide gradient (Bio-Rad Laboratories Inc.). After electrophoresis, gels were stained for 20 min with SYBR Gold nucleic acid gel stain (Molecular Probes) as specified by the manufacturer, and visualized using a transilluminator (UVP, Inc). Bands were excised, re-amplified, purified and sequenced in an ABI3100 genetic analyser using the sequencing kit BigDye v.1.1 (Applied Biosystems). Sequences were identified by BLAST.

Analysis of DGGE profiles

Magnified sections of DGGE gels (six per gel) were photographed with a ChemImager 4000 imaging system (Alpha Innotech) and complete images of each gel were reconstructed using Photoshop software (Adobe). Bands defined as those having an intensity of at least 5% of the most intense band in the sample were scored as present at each position in the gel using the Gel-Pro Analyzer 4.0 software package (Applied Maths). For comparison of banding profiles, a binary matrix was constructed based on the presence (1) or absence (0) of individual bands in each lane. The binary data representing the banding patterns were used to generate a pairwise Dice distance matrix. The distance matrix was used for constructing a multidimensional scaling diagram (MDS), it being a two-dimensional map with artificial x- and y-axis where each DGGE fingerprint is placed as one point in a way that similar samples are plotted together. Clustering analysis and MDS were performed using a Primer 5 software package (Leon et al. 2012).

Strain isolation and identification

A piece of each filter was placed on the surface of a plate containing R₂A agar, samples were incubated at 25°C for 48 hours (Griffin et al. 2001). The colonies grown on the surface of the filter were initially characterized in terms of colony morphology (colour, shape, size), basic microscopic observations and biochemical profiles (RapID ONE System and RapID NF Plus System (Remel)). Then, PCR amplification of 16S rRNA genes was performed using DNA extracted, for each bacterial strain, using the

Intagene Matrix kit (BioRad). For PCR amplification, 16S rDNA bacterial universal primers GM3 (AGAGTTTGATCMTGGC) and GM4 (TACCTTGTTACGACTT) were used, following the procedure described by Ward et al. (1997). Sequencing of the amplified fragments was conducted using the Dyemantic ET terminator cycle sequencing kit (General Electric), in a 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem), according to the manufacturer's instructions. Strains were characterized on the basis of sequences stored in the GenBank database, using the Basic Local Alignment Search Tool program (BLAST version 2.0).

Antimicrobial susceptibility test

The disk diffusion method was used to screen antimicrobial susceptibility in CDC NO-1 strain, following recommendations from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008). Antimicrobials tested and respective disk power were as follows: gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), tetracycline (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), sulfametoazol-trimethoprim (25 µg), chloramphenicol (30 µg), amoxicillin (25 µg), cefotaxime (30 µg) and cefradin (30 µg).

Results and discussion

In accordance with generally used sampling techniques (Fahlgren et al. 2010), our samples collected at the Patagonian lakes Alto, Verde and Esponja are, in fact, bioaerosols. When microorganisms were analysed by SEM, different bacterial cell shapes (bacilli and cocci) attached to the nitrocellulose filter were observed (Fig. 1a, 1b, 1c). There was no evidence of microorganisms adhered to inorganic particles favouring biofilm formation nor the presence of spores or yeasts. Control membranes showed absence of microorganisms under SEM.

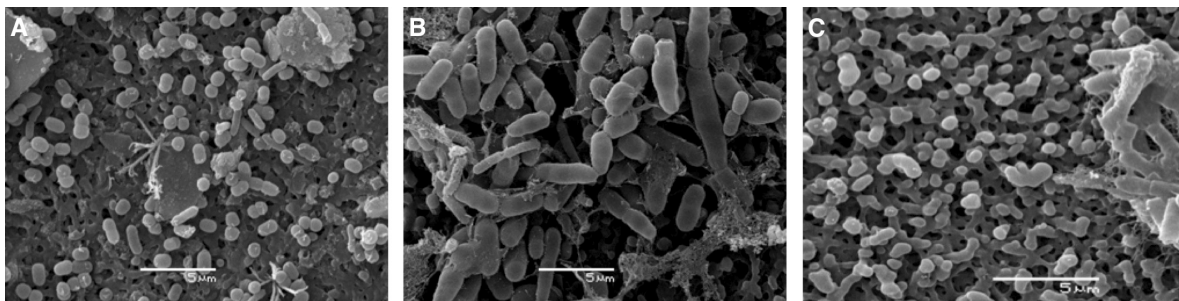


Fig. 1 Scanning Electron Microcopy (SEM) from bioaerosol trapping filter membranes at Chilean Patagonian lakes. A: Alto lake; B: Esponja lake; C: Verde lake

On the other hand, DGGE allowed to study the composition of the bacterial communities being part of the bioaerosols (Fig 2). The analysis of the DGGE banding pattern profiles of the bioaerosol bacterial communities was performed using the Bray–Curtis correlation, a distance matrix was calculated and a cluster analysis was performed resulting in a multidimensional scaling (MDS). These results demonstrated that Alto and Verde lakes have a 60% similarity in the structure of their bacterial communities while Esponja lake has only a 40% similarity when compared to the samples obtained from the other two lakes (Fig. 3).

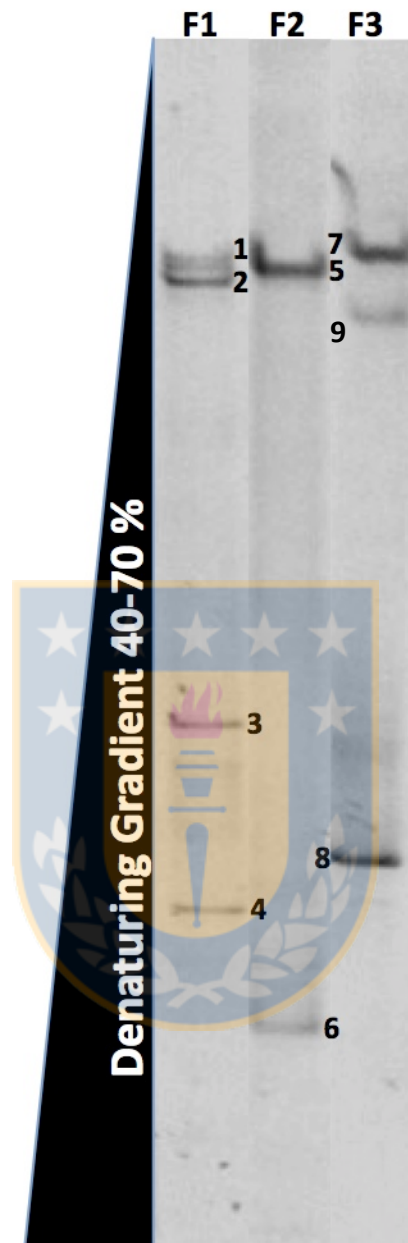


Fig. 2 DGGE (40-70% denaturant gradient) of 16S rDNA products amplified with the primers P2 and P3 (GC-clamp) from bioaerosols trapping filter membranes at Chilean Patagonian lakes. The bands indicated in the figure were excised re-amplified, purified and sequenced. F1: Alto lake; F2: Esponja lake and F3: Verde lake.

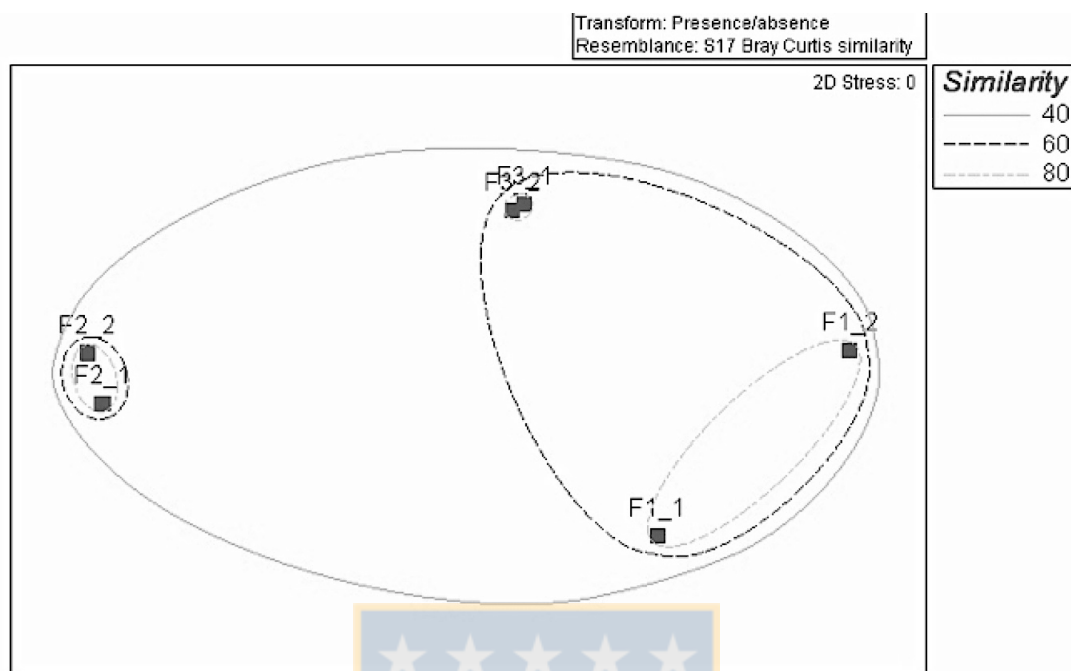


Fig. 3 Multidimensional scaling (MDS) of the DGGE data matrix of bacterial rDNA fragments from the Alto, Esponja and Verde Lake. Similarity index was evaluated by percentages

Also, DGGE bands corresponding to the V3 site were excised and sequenced. After searching for the closest matches to GeneBank, 5 bacterial groups, all identities confirmed with 97 to 100% similarity, 5 bacterial groups: delta-proteobacteria, gamma proteobacteria, alpha proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria were identified (Table 1).

Forty two cultivable isolates were obtained from the three lakes sampled while no cultivable isolates were found in the control membranes (Table 2), indicating that cultivable isolates were collected during the time that air passed through the filters. Subsequent optical microscopy and biochemical profiles showed that from the forty three isolates obtained from the membranes collecting bioaerosols, twenty three of them were Gram positive bacilli, mainly sporulated (although no spores were found under the SEM). The remaining twenty were non-fermenting Gram negative bacilli. Although other authors (Sarica et al. 2002; Augustowska and Dutkiewicz 2006) have reported that Gram positive microorganisms are more abundant in air samples, this study does not show a clear preponderance of one type of bacteria over the other.

Regarding the presence of Gram negative bacteria, it must be emphasized that they are dominant in marine waters and that our sampling area is not that distant from the Pacific ocean which might be influencing the bioaerosols we studied. Since it has been reported that Gram negative bacteria survive better at low relative humidity and Gram positive microorganisms do better at high relative humidity, its effect cannot be disregarded, it being of 74% average at our sampling area.

Table 1. Analysis of 16S rDNA sequences obtained by DGGE

Sample	#Band	Closest sequence relative	ID Gene Bank	Group
Alto	1	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	CP002691.1	Sphingobacteriia
Alto	2	<i>Unculture Acidimicrobium sp</i>	HQ018529.1	Actinobacteria
Alto	3	<i>Unculture Crater Lake bacteria</i>	AF316748.1	Bacteria
Alto	4	<i>Unculture bacteria</i>	AF419662.1	Bacteria
Esponja	5	<i>Pseudomonas sp.</i>	FJ581934.1	Gammaproteobacteria
Esponja	6	<i>Unculture bacteria</i>	FM956845.1	Bacteria
Verde	7	<i>Unculture Bacilli bacterium</i>	EU919219.1	Bacteria
Verde	8	<i>Unculture Klebsiella sp.</i>	JX178708.1	Gammaproteobacteria
Verde	9	<i>Unculture bacteria</i>	GQ134040.1	Bacteria

Optical microscopy and biochemical profiles results associated to the 16s rRNA studies suggested that all isolates represented, in fact, only 8 different isolates. GenBank matches of the DNA sequences revealed that they were *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Moraxella*, *Sphingomonas* and CDC NO-1. *Acinetobacter*, isolated from the three lakes under study (Table 2), has been also found in oligotrophic lakes and frequently reported in bioaerosol samples (Harper et al. 2013; Beggs et al. 2008; Sarica et al. 2002; Hameed and Khodr 2001).

Table 2. Bacterial species isolated and identified from filter samples of Chilean Patagonian lakes

Alto lake	Esponja lake	Verde lake
<i>Acinetobacter</i> (4)	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Acinetobacter</i>
<i>Alcaligenes piechaudii</i>	<i>Moraxella osloensis</i> (2)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
CDC NO-1	<i>Acinetobacter</i>	CDC NO-1
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
		<i>Moraxella osloensis</i>
		<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

Other authors have reported the presence of *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, and *Pseudomonas* as predominant microorganisms in air samples isolated from outdoor environments (Jones and Harrison 2004; Lighthart and Shaffer 1994), and *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Propionibacterium* and *Enterococcus* as predominant organisms in air samples isolated from indoor locations (Sarica et al. 2002; Beggs et al. 2008). Excepting *Acinetobacter* and *Pseudomonas*, none of the remaining bacteria were isolated in this work.

One of the Gram negative strains, identified as CDC NO-1, isolated at two lakes (Alto and Verde) (Table 2), deserves special mention because it is an unusual bacterium associated to dog and cat bites (Kaiser et al. 2002; Winn et al. 2008). This microorganism was isolated for the first time in 1974, when the Special Bacteriological Reference Laboratory (SBRL) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) of USA received a bacterial strain from a bite wound in Texas, USA, it turned out to be non-oxidative and named non-oxidative group 1 (NO-1) (Kaiser et al. 2002). So far, there is no information available about possible virulence factors for the strain NO-1 nor the sequence of this strain has been reported in nucleotide databases. In SBRL, studies are being carried out to determine the taxonomic classification of NO-1 (Kaiser et al. 2002). However, due to the fact this strain is isolated with a low frequency, there is scarce information about it.

Hollis et al (1993), Kaiser et al (2002) and Winn et al (2008) indicated that the phenotypic characteristics of CDC NO-1 are similar to those observed in *Acinetobacter lwoffii* as well as in other non acid producing species of *Acinetobacter*. In addition, when the two isolates (one from lake Alto and one from lake Verde) originally classified as CDC NO-1 by the Rapid system, were subjected to rDNA 16S sequencing, it was possible to identify both isolates as *Acinetobacter lwoffii* (Genbank access nº NR 026209). According to Winn et al (2008), CDC NO-1 strains can be easily differentiated from *Acinetobacter* species because the CDC strain is positive for nitrate reduction. Since our isolates from lakes Alto and Verde were positive for this test, we can conclude that CDC NO-1 (Genbank access nº Hx2000035402) is present in the bioaerosols of at least two Chilean Patagonian lakes (Table 3).

Zucker et al. (2001) reported that airborne Neisseriaceae were very frequently isolated in cow barns and that *Acinetobacter lowffii* was the most abundant in a study including four cattle houses, one pig house and one poultry barn. It is possible that the report of *Acinetobacter lowffii* by these authors could, in fact, have been CDC NO-1; nevertheless, the biochemical profile alone, in the absence of nitrate reduction test, can not clear this issue.

To better characterize both CDC NO-1 isolates, their antibiotic resistances were also studied. Results indicated that the one isolated at Alto Lake was resistant to two aminoglycosides (gentamycin and amikacin) while the one isolated at Verde Lake was resistant to the same aminoglycosides but additionally to one cephalosporin (data not shown). Hollis et al (1993) studied 17 of the 22 CDC NO-1 USA stains showing that all of them were susceptible to aminoglycosides, beta-lactams, tetracyclines, quinolones and sulfonamides and 50% of them were susceptible to trimethoprim (Hollis et al. 1993). Therefore, the antibiotic resistance of the Patagonian CDC NO-1 isolates differ from that reported in the literature for isolates from other places in the world. Although specific search for genes conferring antibiotic resistance was not performed, since plasmids were detected in both Patagonian CDC NO-1 isolates, it is possible that their antibiotic resistance was harboured in them. Since CDC NO-1 has a low frequency of isolation and there are no other reports available for this bacterium in South America, the resistance mechanism of the Patagonian isolates remains still unknown.

The environment gives microbiota of bioaerosols the possibility to spread and colonize ecosystems around the world and thus affect ecosystems and human health through the spread of pathogens. Therefore, the ubiquitous presence of air microbiota might be more important than previously thought and the transport of viable microorganisms by bioaerosols will require detailed studies. Climatic changes, and possibly other factors, favouring bioaerosols dissemination over long distances make even more relevant this type of studies, particularly in the case of pristine environments, such as the case of the Patagonia.

Studies culturing microorganisms from atmospheric bioaerosols indicate predominance of Gram-positive bacteria, however the present study has shown that Gram-negative microorganisms may become relevant members of the bioaerosols microbiota and that molecular techniques are useful to efficiently identify them. Since Mendoza et al. (2006) reported the presence of pollutants (POPs, PCBs) in remote Patagonian lakes of Chile, long-range transport of bioaerosols into Patagonia must be considered as a possibility. The presence of CDC NO-1, here reported, also supports this possibility. On the other hand, the abundance of Gram negative microorganisms could support a regional origin. Therefore, Patagonian bioaerosols can include a mixture of microorganisms of distant and regional origin.

This work demonstrates, for the first time, the presence of CDC NO-1, a clinically important Gram negative microorganism, in bioaerosols. Besides its presence in remote lakes, its antibiotic resistance is worth mentioning.

Acknowledgment. This work was supported by Conicyt project N° 24110114 and DIUC project: 211.36.39.1. The authors also thank to Jorge Jimenez, PhD, of the University of Concepción.



References

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.

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

Beggs, C.B., Kerr, K.G., Noakes, C.J., Hathway, E.A, Sleight, P.A. (2008) The ventilation of multiple-bed hospital wards: review and analysis. *American Journal of Infection Control*, 36, 250-259.

Birch, M.E. (1998). Analysis of carbonaceous aerosols - Interlaboratory Comparison. *Analyst*, 123, 851-857.

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.

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 75, 4801-4805.

Campos,V.L., León. C., Mondaca, M.A., Yañez, J., Zaror, C. (2011) Arsenic mobilization by epilithic bacterial communities associated with volcanic rocks from Camarones River Atacama Desert Northern Chile. Archives Environmental Contamination and Toxicology, 61,185-192.

Catalan, J., Camarero, L., Felip, M., Pla, S., Ventura, M., Buchaca, T., Bartumeus, F., De Mendoza, G., Miró, A., Casamayor, E.O., Medina-Sánchez, J.M., Bacardit, M., Altuna, M., Bartrons, M., Díaz de Quijano, D. (2006) High mountain lakes: extreme habitats and witnesses of environmental changes. Limnetica, 25, 551-584.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved standard M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cox, C.S., Wathes, C.M. (1995) Bioaerosols Handbook. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003) Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. Annals of Occupational Hygiene, 47, 187–200.

Dowd, S.E., Maier, R.M. (2000) Aeromicrobiology. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP (Eds.). Environmental Microbiology, San Diego, California: Academic Press, pp 91-122.

Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., Usami, R. (2005) Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline

Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems*, 1–8.

Fahlgren, C., Hagstrom, A., Nilsson, D., Li, U. (2010) Annual Variations in the Diversity, Viability, and Origin of Airborne Bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 3015–3025.

Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied. Environmental Microbiology* 62, 340-346.

Griffin, D.W., Garrison, V.H., Herman, J.R., Shinn, E.A. (2001) African desert dust in the Caribbean atmosphere: microbiology and public health. *Aerobiologia*, 17 (3), 203–213.

Griffin, D.W., Kellogg, C.A., Garrison, V.H., Lisle, J.T., Borden, T.C., Shinn, E.A. (2003) Atmospheric microbiology in the northern Caribbean during African dust events. *Aerobiologia*, 19, 143-157.

Griffin, D.W. (2004) Terrestrial microorganisms at an altitude of 20,000m in Earth's atmosphere. *Aerobiologia*, 20, 135–140.

Griffin, D.W., Douglas, A.E., Westphal, A.E., Gray, M.A. (2006) Airborne microorganisms in the African desert dust corridor over the mid-Atlantic ridge, Ocean Drilling Program, Leg 209. *Aerobiologia*, 22, 211-226.

Grimalt, J., Fernandez, P., Berdie, L., Vilanova, R., Catalan, J., Psenner, R., Hofer, R., Appleby, P., Rosseland, B., Lien, L., Massabuau, J., Battarbee, R. (2001) Selective Trapping of Organochlorine Compounds in Mountain Lakes of Temperate Areas. *Environmental Science Technology*, 35 (13), 2690-2697.

Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P. (1999) *Quantitative Microbial Risk Assessment*. John Wiley & Sons, Inc, New York.

Hameed, A., Khodr, M.I. (2001) Suspended particulates and bioaerosols emitted from an agricultural non-point source. *Journal Environmental Monitoring*, 3, 206-209.

Harper, T., Bridgewater, S., Brown, L., Pow-Brown, P., Stewart-Johnson, A., Adesiyun, A. (2013) Bioaerosol sampling for airborne bacteria in a small animal veterinary teaching hospital. *Infection Ecology and Epidemiology*, 3, 20376

Hollis, D., Moss, C., Daneshvar, M., Meadows, L., Jordan, J., Hill, B. (1993) Characterization of Centers for Disease Control group NO-1, a fastidious, nonoxidative, gram-negative organism associated with dog and cat bites. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 746–748.

Isard, S.A., Gage, S.H. (2001) *Flow of Life in the Atmosphere: An Airscape Approach to Understanding Invasive Organisms*, Michigan State University Press: Detroit, MI, USA, pp 304.

Jones, A.M., Harrison, R.M. (2004) The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations a review. *Science Total Environmental*, 326, 151–180.

Jones, S.E., Newton, R.J., McMahon, K.D. (2008) Potential for atmospheric deposition of bacteria to influence bacterioplankton communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 64, 388–394.

Kaiser, R.M., Garman, R.L., Bruce, M.G., Weyant, R.S., Ashford, D.A. (2002) Clinical significance and epidemiology of NO-1, an unusual bacterium associated with dog and cat bites. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 171–4.

Kuske, C.R. (2006) Current and emerging technologies for the study of bacteria in the outdoor air. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 291–296.

Lacey, M.E., West, J.S. (2006) *The Air Spora: A Manual for Catching and Identifying Airborne Biological Particles*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Leon, C., Campos, V., Urrutia, R., Mondaca, M.A. (2012) Metabolic and molecular characterization of bacterial community associated to Patagonian Chilean oligotrophic-lakes of quaternary glacial origin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1511–152.

Lighthart, B., Shaffer, B.T. (1994) Bacterial flux from chaparral into the atmosphere in mid-summer at a high desert location. *Atmospheric Environmental*, 28, 1267–1274.

Morales-Baquero, R., Pulido-Villena, E., Romera, O., Ortega-Retuerta, E., Conde-Porcuna, J.M., Pérez-Martínez, C., Reche, I. (2006) Significance of atmospheric deposition to freshwater ecosystems in the southern Iberian Peninsula. *Limnetica*, 25, 171–180.

Mendoza, G., Gutiérrez, L., Pozo-Gallardo, K., Fuentes-Ríos, D., Montory, M., Urrutia, R., Barra R. (2006) Polychlorinated biphenyls (PCBs) in mussels along the Chilean coast. *Environmental Science Pollution Research*, 13, 67-74.

Moulin, C., Chiapello, I. (2006) Impact of human-induced desertification on the intensification of Sahel dust emission and export over the last decades. *Geophysical Research Letters*, doi:10.1029/2006GL025923.

Neff, J.C., Ballantyne, A.P., Farmer, G.L., Mahowald, N.M., Conroy, J.L., Landry, C.C., Overpeck, J.T., Painter, T.H., Lawrence, C.R., Reynolds, R.L. (2008) Increasing Eolian Dust Deposition in the Western United States Linked to Human Activity. *Nature Geoscience*, 1, 189-195.

Polymenakou, P. (2012) Atmosphere: A Source of Pathogenic or Beneficial Microbes?. *Atmosphere*, 3, 87-102.

Prospero, J.M., Blades, E., Mathison, G., Naidu, R. (2005) Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, 1, 1–19

Sarica, S., Asan, A., Otkun, M.T., Ture, M. (2002) Monitoring indoor airborne fungi and bacteria in the different areas of Trakya University Hospital, Edirne, Turkey. *Indoor and built Environment*, 11, 285–292.

Sattler, B., Puxbaum, H., Psenner, R. (2001) Bacterial growth in super cooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters*, 28, 239–242.

Smith, D.J., Jaffe, D.A., Birmele, M.N., Griffin, D.W., Schuerger, A.C., Hee, J., Roberts, M.S. (2012). Free tropospheric transport of microorganisms from Asia to North America. *Microbial Ecology*, 64, 973-985.

Stetzenbach, L.D., Buttner, M.P., Cruz, P. (2004) Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15,170-174.

Tang, J.W. (2009) The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J. R. Soc. Interface*, 6, S737-S746.

Vighi, M. (2006). SETAC Europe Workshop Milan, Italy, 1-3 July 2004 Department of Environmental Sciences, University of Milano-Bicocca. The role of high mountains in the global transport of persistent organic chemicals'. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63,108-112.

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schrenckenberger, P., Woods, G. (2008) Koneman -Diagnóstico Microbiológico. Argentina, Editorial Médica Panamericana.

Ward, B., Voytek, M.A., Witzel, K.P. (1997) Phylogenetic diversity of natural populations of ammonia oxidizers investigated by specific PCR amplification. *Microbial Ecology*, 33, 87-96.

Zucker, B.A., Rojan, S.T., Muller, W. (2000) Airborne Gram-Negative Bacterial Flora in Animal Houses. *Journal Veterinary Medicine*, B 47, 37-46.

CAPITULO V

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF AIRBORNE BACTERIA ISOLATED FROM ATACAMA DESERT IN CHILE



Guisella Escalante ^{1,2}; Carla G León ¹; Benner Giacomozzi ¹; Santiago Mafla ¹; María Angélica Mondaca ¹; Víctor L Campos ^{1*}. Antibiotic susceptibility of airborne bacteria isolated from Atacama desert in Chile. *Aerobiologia* (submitted)

Antibiotic susceptibility of airborne bacteria isolated from Atacama Desert in Chile

Guisella Escalante ^{1,2}; Carla G León ¹; Benner Giacomozzi ¹; Santiago Mafla ¹; Víctor L Campos ^{1*}; María Angélica Mondaca¹

(1) Microbiology Department, Biological Science Faculty, University of Concepción,
P.O. Box 160-C,
Mail 3, Concepcion, Chile.

(2) EULA-CHILE Center, University of Concepción, Concepción, Chile

*Corresponding author: guiescalante@udec.cl, Phone +56 41 2204118.

Abstract

Those microorganisms present in desert dust not only may affect humans, plants, animals and environment; many bacteria may carry resistance genes to antibiotics of clinical importance. The development of antibiotic resistance in pathogenic bacteria is a serious and growing health concern. One particularly problematic development is the emergence of multi resistance; that is, bacteria becoming resistant to many, if not all, medically used antibiotics. The objective of this work was characterize the cultured bacteria, isolated from bioaerosols, based on colony morphology and antibiotic resistance. The samples were taken from Huara zone, the strains isolated were biochemical and molecular identified and also were submitted to an antimicrobial susceptibility testing. Results demonstrated the presence of bacteria in bioaerosols resistant to antibiotics commonly used in hospital environment sector. In some bacteria isolated and identified, the presence of plasmids was detected and furthermore genes related to the characteristic of to be broad host range plasmids were amplified.

Keywords

Airborne bacteria, plasmid, IncP, antibiotic resistance and Atacama Desert

Introduction

In recent years a number of factors have stimulated an increased awareness of the presence of potentially pathogenic airborne bacteria in indoor and outdoor environments and the detrimental health effects associated with them (Lin and Li 2002). In order to airborne transmission take place the microorganisms of interest must enter the air stream, which can happen through a variety of routes.

Several works have also demonstrated that dust clouds may serve not only as periodic source of nutrients for terrestrial plants and primary producers in nutrient depleted oceanic waters (Duarte et al. 2006), but may also serve as a medium for global transport of microorganisms, including pathogens (Shinn et al. 2000; Griffin et al. 2001; Brown and Hovmøller 2002; Prospero et al. 2005).

Those microorganisms present in desert dust not only may affect humans, plants, animals and environment many bacteria may carry resistance genes to antibiotics of clinical importance (Alleem et al. 2003). The development of antibiotic resistance in pathogenic bacteria is a serious and growing health concern. One particularly problematic development is the emergence of multi resistance; that is, bacteria becoming resistant to many, if not all, medically used antibiotics. Antibiotic resistant strains are a global public health problem. Past reports have principally focused on the detection of antibiotic resistant bacteria in hospital-acquired infections. Recently, with the discovery of multi-resistant strains in the broader community, public health officials have begun to realize the potential danger of the spread of these antibiotic resistant bacteria (Zhou and Wang 2013). Public areas should be the subject of particular scrutiny, as antibiotic resistant strains are likely to spread through crowds and people in close contact in these areas. By now, antibiotic resistant strains can be found in public areas like schools (Sobhy et al. 2012), shopping centers or markets (Nobile et al. 2013), offices (Reynolds 2005) and so on. The inspection of antibiotic

resistant strains in community was of important meaning to the control of community-acquired infections. (Zhou and Wang 2013).

Transmission of antimicrobial resistant bacteria can occur through direct contact, contaminated water, air, environment, and food (Akwar et al. 2007). According to the Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health team, inhalation of airborne bacteria could constitute an exposure pathway that resistance may be transferred to humans.

The rapid expansion of antibiotic resistant bacteria is seen as one of the major emerging public health issues in modern society. Pathogenic bacteria can develop resistance to antibiotics which previously were successful in combating infections caused by specific bacterial strains, resulting in increased morbidity and mortality worldwide (WHO 2012). Microbes especially pathogenic bacteria can have resistance to antibiotics naturally and pass this genetic material to offspring through replication. Bacteria can also acquire genetic resistance through the exchange of genetic material from cell-to-cell interactions through horizontal gene transfer (Perron et al. 2012).

The objective of this work was characterize the cultured bacteria, isolated from bioaerosols, based on antibiotic resistance and transfer capacity.

Material and Methods

Sampling

Field studies were sited outside of Huara, approximately 80 km northeast of Iquique, Chile. Samples were collected at 19°59'25.6"S 069°44'24. 5" W. Airborne bacteria samples were obtained collected by membrane filtration, 2,5 meters above water level, using a MiniVol Tactical Air Sampler (Air metrics) with an airflow of 5 liters per minute, (Birch 1998).

Membranes were aseptically removed from the filtration equipment and placed in sterile bags, sealed with tape and refrigerated (4°C) for later analysis. Additional membranes were used as control, they been placed on the vacuum pump and left without removing the cover or switching on the pump.

Strain isolation and identification

A piece of each filter was placed on the surface of a plate containing R₂A agar, samples were incubated at 25°C for 48 hours (Griffin et al. 2001). The colonies grown on the surface of the filter were characterized by colony morphology and microscopic appearance after Gram staining. The isolates were then sub cultured on appropriate culture media and further identification was done using biochemical test such as characteristics on triple sugar iron agar, citrate utilization, indole production, urease production, motility to identify the isolates to genera/species levels.

Then, PCR amplification of 16S rRNA genes was performed using DNA extracted, for each bacterial strain, using the Instagene Matrix kit (BioRad). For PCR amplification, 16S rDNA bacterial universal primers GM3 (AGAGTTTGATCMTGGC) and GM4 (TACCTTGTTACGACTT) were used, following the procedure described by Ward et al. (1997). Sequencing of the amplified fragments was conducted using the Dyematic ET terminator cycle sequencing kit (General Electric), in a 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Bio system), according to the manufacturer's instructions. Strains were characterized on the basis of sequences stored in the GenBank database, using the Basic Local Alignment Search Tool program (BLAST version 2.0).

Antimicrobial susceptibility testing

The disk diffusion method was used to screen antimicrobial susceptibility in the six selected strains, following recommendations from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008). The following antibiotics were tested (ug of antibiotic per disk in parenthesis): ampicillin (10), ceftazime (30), chloramphenicol (30), tetracycline (30), gentamicin (10), amikacin (30), rifampicin (5), sulfamethoxazol-trimethoprim (25).

Isolation of plasmid DNA

Selected Gram-negative bacteria were harvested from 5-ml overnight cultures with agitation. Plasmid extractions were performed with Plasmid Mini Kit II (Omega, Bio-

Tek, USA) and analyzed on 0.8% agarose gels with a λ DNA-HindIII marker as molecular weight standard (Götz et al.1996).

Then to amplify broad-host-range conjugative IncP regions related to replication an oligonucleotide primers were used (IncP, trfA1/2 and korA) and to transfer (IncP, oriT and traG). PCRs were performed as described in Götz et al. (1996). For product size confirmation the PCR products were loaded onto 1.5% agarose gels with Maestro Safe nucleid acid gel stain reagent and submitted to electrophoresis for 1 h at 90 V (Götz et al.1996)

Results and discussion

Thirty seven cultured bacteria were obtained from bioaerosols of Atacama Desert, while no cultivable isolates were found in filtration membranes that serve as controls that shows us that cultivable isolates were collected from the air that passed trough the filters. Microscopy observations and biochemical profiles showed that from the twenty-six isolates obtained from the membranes collecting bioaerosols, thirteen of them were Gram-positive bacilli. The remaining ten were non-fermenting Gram negative bacilli (data not shown). Some authors indicated that Gram-positive microorganisms are more abundant in air samples (Sarica et al. 2002; Augustowska and Dutkiewicz 2006); the results of this work not show a clear preponderance of one type of bacteria over the other.

With the observation of strain isolation results, seven morphotypes were selected and identified by molecular techniques. GenBank matches of the DNA sequences revealed that they were *Acinetobacter*, *Pseudomonas putida* (2), *Stenotrophomonas maltophilia* (2) and *Bacillus senegalensis* (Table 1).

In the present work, one of the strains identified as *Stenotrophomonas maltophilia* showed resistance to several antibiotics while the other strain isolated and identified, as *Stenotrophomonas maltophilia* JV3 not present any antibiotic resistance.

Stenotrophomonas maltophilia was originally considered to be a harmless commensal but is now emerging as an important nosocomial pathogen in the immunocompromised, in cancer patients, in transplant recipients and patients

undergoing peritoneal dialysis (Juliet and Fernandez 2006). Being a low pathogenic microorganism whose natural habitat is the aquatic environment, its importance lies in nosocomial disease, mainly due to its high antimicrobial resistance, which favors their selection. In other hand *Stenotrophomonas maltophilia* JV3 is consider just an environmental strain.

In the lasts years a number of factors have stimulated an increased the presence of potentially pathogenic bioaerosols in indoor and outdoor environments and the detrimental health effects associated with them (Lin and Li 2002). Humans can fall prey to a whole range of viral and bacterial diseases, which are transmitted via the airborne route from one infectious individual to another susceptible victim. Infectious aerosols tend to be extremely small (< 5µm) and can therefore remain suspended and viable in the air stream over long periods of time.

Table 1. Bacterial species isolated and identified from bioaerosols samples isolated in Atacama Desert, Chile

Isolates	Genera/Species	Family
UC-220	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Moraxellaceae</i>
UC-225	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Moraxellaceae</i>
UC-226	<i>Pseudomona putida</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
UC-233	<i>Pseudomona putida</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
UC-256	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>
UC-258	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JV3)	<i>Xanthomonadaceae</i>
UC-273	<i>Bacillus senegalensis</i>	<i>Bacillaceae</i>

Acinetobacter is frequently bacteria reported in bioaerosol samples (Harper et al. 2013; Beggs et al. 2008; Sarica et al. 2002; Hameed and Khodr 2001). Other authors have reported the presence of *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, and *Pseudomonas* as predominant microorganisms in air samples isolated from outdoor environments (Jones and Harrison 2004; Lighthart and Shaffer 1994), and *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Propionibacterium* and *Enterococcus* as predominant organisms in air samples isolated from indoor locations (Sarica et al. 2002; Beggs et al. 2008).

Although *Acinetobacter* sp. is ubiquitous in the environment they are associated with a wide range of infections particularly in immunocompromised individuals. Infections are becoming more difficult to treat as multi-drug resistant strains emerge. There is increasing evidence that *Acinetobacter* sp. are transmitted via the airborne route (Beggs et al. 2002)

There are a whole range of bacteria, which are of concern regarding those individuals which are with immunological and health problems. *Pseudomonas putida* is a Gram-negative rod, aerobic which can be isolated in the soil and in the water or as clinical specimen and sometimes behaves as an opportunistic pathogen (Goenaga M.A et al. 2005)

To better characterize the isolates, their antibiotic resistances were also studied. Results indicated that only two strains identified were susceptible to all the antibiotics tested. The other five strains were resistance to at least two antibiotics. All the antibiotics used in this work are usually used in hospitals environment (Table 2)

All the selected and identified Gram-negative bacteria of the samples were subjected to plasmid search and four of the seven strains have plasmid (results not shown). Then to amplify broad-host-range conjugative Inc regions related to replication an oligonucleotide primers were used (Inc, trfA1) and to transfer (Inc, Orit). The product size of the PCR products (110 bp for OriT and 889 bp for trfA1) confirmed the presence of broad host range plasmid (Fig 1 and 2) (Gotz et al 1996).

The importance of horizontal gene transfer in the evolution and diversification of bacteria is now well established. Plasmids play a primordial role in these exchanges. The rapid dissemination of antibiotic resistance genes in bacterial populations as a consequence of the intensive use of antibiotics in medicine and agriculture can be partly attributed to plasmid-mediated horizontal transfer (Zechner et al. 2000; Grohmann et al. 2003; Franiczek et al. 2006).

Table 2. Phenotypes of antibiotic resistance among airborne bacteria collected from Atacama Desert

Bacteria	Antibiotic resistance pattern
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JV3)	–
<i>Pseudomona putida</i>	–
<i>Acinetobacter</i> sp.	Amp / Amk
<i>Acinetobacter</i> sp.	Amp / Chlr
<i>Pseudomona putida</i>	Amp / Gen / Chlr / T et
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Amp / Ceft / Gen / Tet
<i>Bacillus senegalensis</i>	Amp / Ceft / Gen / Amk / Tet

Amp: Ampicilline; Amk:Amikacine; Chlr:Chloranphenicol: Gen: Gentamicine

(-): None antibiotic resistance

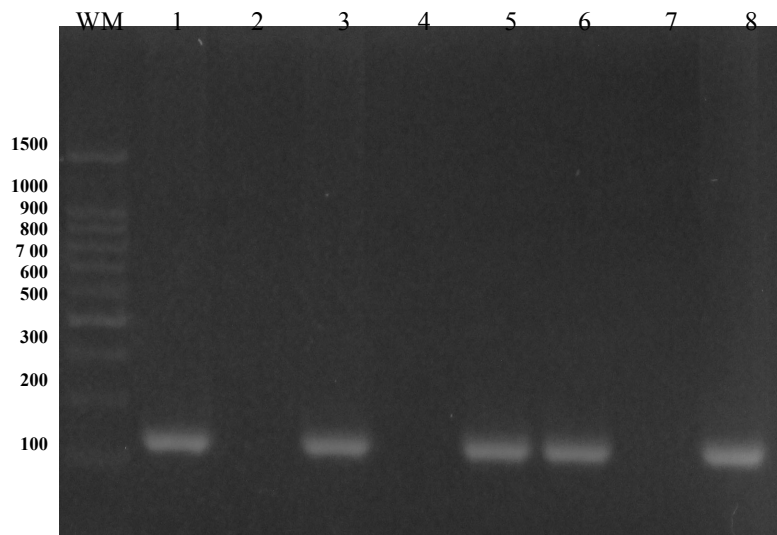


Fig 1. Agarose gel (1.5%) of IncP *oriT* PCR product from plasmid found in bacterias isolated from bioaerosols of Huara zone. Lane 1, 23 strain; lane 2, 181 strain; lane 3, 249 strains; lane 4, 250 strain; lane 5, 252 strain; lane 6, 253 strains; lane 7, 300.; lane 8, positive control.



Fig 2. Agarose gel (1.5%) of IncP *trfA1* PCR product from plasmid found in bacterias isolated from bioaerosols of Huara zone. Lane 1, 23 strain; lane 2, 181 strain; lane 3, 249 strains; lane 4, 250 strain; lane 5, 252 strain; lane 6, 253 strains; lane 7, 300.; lane 8, positive control.

Resistance genes could transfer to pathogenic bacteria via contact with the environment causing untreatable infections in animals and humans (Nwosu 2001). Plasmids provide their host with a large array of phenotypes: antibiotic (Datta and Hughes 1983) or heavy metal, resistance (Silver 1996; Malik et al. 2002; Aleem et al. 2003), the ability to degrade recalcitrant compounds and to use them as carbon and energy source (Top et al. 1998; Nawab et al. 2003). Plasmids capable of being transferred and stably maintained in a wide range of bacteria also called broad host range (BHR) plasmids can transfer or mobilize their genes into taxonomically distant species (Thomas 2000). Most plasmids belonging to the Inc groups IncP, IncN, IncW are conjugative and many IncQ and rolling circle plasmids are mobilizable (Gótz et al. 1996; Haines et al. 2006; Smalla et al. 2006). Plasmids from these Inc groups have been frequently detected in environmental systems (Gótz et al. 1996; Smalla et al. 2006).

Very little is known about the prevalence of these plasmids in the environment. Most of the current knowledge comes from plasmids isolated from clinical material or from studies on plasmid-mediated dissemination of antibiotic and/or heavy metal resistance genes (Tschäpe et al. 1994), in which plasmids were usually isolated after selective cultivation of bacteria with subsequent screening for the presence of plasmids.

Plasmids have an important role in the spread of antibiotic-resistance genes between bacteria and in the development of multiresistance (Fluit 2005; Schlüter et al 2007; Tennstedt 2003). Knowledge of the manner in which plasmids evolve is thus important if we are to better understand the fundamentals of prokaryotic evolution and the principles underlying the accumulation and spread of antibiotic resistance in bacterial communities.

Furthermore, they can also harbor a wide spectrum of antibiotic-resistance genes (Schlüter et al. 2007). It has been suggested that recent human activities, such as the use of wastewater treatment plants that mix bacteria from a large number of sources, would increase contacts between bacteria and therefore increase recombination between plasmids (Schlüter et al. 2007).

Research into IncW plasmids (Fernández-López et al. 2006) and F plasmids (Boyd et al. 1996) has suggested recombination, and that rare recombination events may be a driving force behind the creation of new plasmid families. The IncP-1 plasmid group has a broad host range and can be stably maintained in almost all Gram-negative bacteria. A recent study using genomic signatures also suggested a broad host range of the IncP-1 plasmids (Susuki et al. 2010; Norberg 2011)

Conjugative plasmids of the IncP group are of particular interest because they are capable of mediating efficient DNA transfer between virtually any Gram-negative species (Fürstte et al. 1989). This promiscuity is important because of its role in the spread of antibiotic resistance and its application to gene manipulation in widely different bacteria. (Fürstte et al. 1989)

This is the first report that demonstrated the presence of bacteria in bioaerosols, resistant to antibiotics commonly used in hospital environment sector.

It is also the first evidence of the presence of plasmids in bacteria from outdoor bioaerosols and furthermore is the first evidence of the presence of Broad-Host-Range Plasmids.

Acknowledgment. This work was supported by Conicyt project N° 24110114 and DIUC project: 211.36.39.1. The authors also thank to Jorge Jimenez, PhD, of the University of Concepción, Chile

References

Akwar TH, Poppe C, Wilson J, Reid-Smith, R.J., Dyck, M, Waddington, J., Shang, D., Dassie, N., McEwen, S.A. (2007). Risk factors for antimicrobial resistance among fecal *Escherichia coli* from residents on forty-three swine farms. Microbial Drug Resistance. Spring;13(1):69-76.

Aleem, A., Isar, J., Malik, A. (2003). Impact of long-term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizospheric soil. , Bioresource Technology, 86: 7–13.

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.

Beggs, C.B., Kerr, K.G., Noakes, C.J., Hathway, E.A, Sleight, P.A. (2008) The ventilation of multiple-bed hospital wards: review and analysis. American Journal of Infection Control, 36, 250-259.

Birch, M.E. (1998). Analysis of carbonaceous aerosols - Interlaboratory Comparison. Analyst, 123, 851-857.

Boyd, E. F., Hill, C. W., Rich, S. M. & Hartl, D. L. (1996). Mosaic structure of plasmids from natural populations of *Escherichia coli*. Genetics 143, 1091–1100.

Brown, J.K.M., Hovmoller, M.S., (2002). Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. Science 297, 537–541.

Datta, N., Hughes, V.M. (1983). Plasmids of the same Inc group in enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature* 306: 616–617.

Duarte, C.M., Dachs, J., Llabrés, M. Alonso-Laita, P., Gasol, J. M., Tovar-Sánchez, A. Sañudo-Wilhelmy, S.A., Agustí, Susana (2006) Aerosol inputs enhance new production in the subtropical northeast Atlantic. *Journal of Geophysical Research*. DOI: 10.1029/2005JG000140.

Fernández-López, R., Garcillán-Barcia, MP, Revilla, C, Lázaro, M, Vielva L, de la Cruz F. (2006). Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 942–966.

Fluit, A. C. T(2005).owards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol. Journal of Medical Microbiology*. 43, 1–11

Franiczek, R., Dolna, I., Krzyzanowska, B., Szufnarowski, K., Kowalska, K.B., Zielinska, M. (2006). Conjugative transfer frequency of resistance genes from ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains isolated from patients hospitalised in paediatric wards. *Med Dosw Mikrobiol* 58: 41–51.

Furstett, J.P., Pansegraut, W., Ziegelint, G., Kroger, M., Lanka, E. (1989). Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: Interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. *Proc Natl Acad Sci USA*. Mar;86(6):1771-5.

Goenaga, A., Millet, M., Carrera, A., Garde, C. (2005). Infección nosocomial por *Pseudomonas putida*. *Anales de Medicina Interna*. 22(4): 201-202.

Gotz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschape, H., VanElsas, J. D., Smalla, K. (1996). Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Applied Environmental Microbiology* 62, 2621–2628.

Griffin, D.W., Garrison, V.H., Herman, J.R., Shinn, E.A. (2001) African desert dust in the Caribbean atmosphere: microbiology and public health. *Aerobiologia*, 17 (3), 203–213.

Grohmann, E., Muth, G., Espinosa, M.(2003). Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 277–301.

Haines, A.S., Akhtar, P., Stephens, E.R., Jones, K., Thomas, C.M., Perkins, C.D., Williams, J.R., Day, M.J., Fry JC (2006). Plasmids from freshwater environments capable of incq retro transfer are diverse and include pQKH54, a new incp-1 subgroup archetype. *Microbiology* 152: 2689–2701.

Hameed, A., Khodr, M.I. (2001) Suspended particulates and bioaerosols emitted from an agricultural non-point source. *Journal Environmental Monitoring*, 3, 206-209.

Harper, T., Bridgewater, S., Brown, L., Pow-Brown, P., Stewart-Johnson, A., Adesiyun, A. (2013) Bioaerosol sampling for airborne bacteria in a small animal veterinary teaching hospital. *Infection Ecology and Epidemiology*, 3, 20376

Juliet, C., Fernandez, A. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia*. *Revista Chil ena de Infectología*, 23, 3, 247-248.

Lighthart, B., Shaffer, B.T. (1994). Bacterial flux from chaparral into the atmosphere in mid-summer at a high desert location. *Atmospheric Environment Journal*, 28, 1267–1274.

Lin, C.Y., Li, C.S. (2002). Control effectiveness of ultraviolet germicidal irradiation on bioaerosols. *Aerosol science & Technology*, 36, 474-478

Nawab, A., Aleem, A., Malik, A. (2003) Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to γ -HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *B88*: 41–46.

Nobile, C., Costantino, R., Bianco, A., Pileggi, C., Pavia, M. (2013). Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control*. 32:715–718.

Norberg, P., Bergstrom, M., Jethava, V., Dubhashi, D., Hermansson, M. (2011). The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination. *Nature Communication*. 2, 268.

Nwosu, V.C. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research in Microbiology* 152: 421–430.

Perron, G.G., Lee, A.E., Wang, Y., Huang, W.E., Barraclough, T.G. (2012). Bacterial recombination promotes the evolution of multi-drug resistance in functionally diverse populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, pages: 1477-1484.

Prospero, J.M., Blades, E., Mathison, G., Naidu, R. (2005) Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, 1, 1–19

Reynolds K.A., Watt P.M., Boone S.A., Gerba C.P. (2005). Occurrence of bacteria and biochemical markers on public surfaces. *Int. J. Environ. Health Res.* 15:225–234.

Sarica, S., Asan, A., Otkun, M.T., Ture, M. (2002) Monitoring indoor airborne fungi and bacteria in the different areas of Trakya University Hospital, Edirne, Turkey. *Indoor and built Environment*, 11, 285–292.

Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., Top, E. M. (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 449–477.

Shinn, E.A, Smith, G. W, Prospero, J.M, Betzer, P, Hayes, M.L., Garrison, V., Barber, R.T. (2000). African Dust and the demise of Caribbean coral reefs. *Geology Research Letters*, 27, 3029-3032.

Silver, S. (1996). Bacteria resistance to toxic metal ions: review. *Gene* 179: 9–19.

Smalla, K., Haines, A.S., Jones, K., Krogerrecklenfort, E., Heuer, H., Schlöter, M., Thomas, C.M. (2006). Increased abundance of IncP-1 (beta) plasmids and mercury resistance genes in polluted river sediments-first discovery of IncP-1 (beta) plasmids with a complex *mer* transposon as sole accessory element. *Applied Environmental Microbiology* 72: 7253–7259.

Sobhy N., Aly F., Abd El Kader O., Ghazal A., Elbaradei A. (2012). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin and soft tissue infections (in a sample of Egyptian population): Analysis of *mec* gene and staphylococcal cassette chromosome. *Braz. J. Infect. Dis.* 16:426–431.

Suzuki, H., Yano, H., Brown, C. J. & Top, E. M. Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *J. Bacteriol.* 192, 6045–6055 (2010).

Thomas, C.M. (2000). The Horizontal Gene Pool. Bacterial plasmids and gene spread, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Top, E.M., Van Elsas, E.D., DeSmet, S.N., Forney, L.J. (1998) Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 87–94.

Tschäpe, H. (1994). The spread of plasmids as a function of bacterial adaptability. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15:23–32.

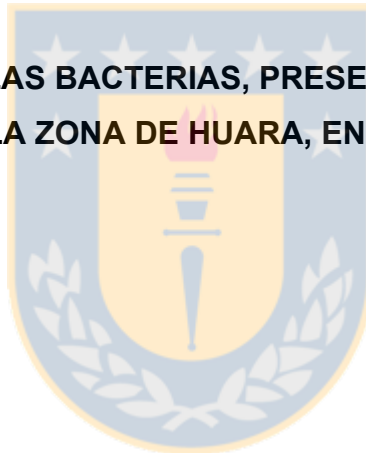
WHO.(2012). Antibiotic Resistance Fact Sheet 2012.

Zechner, E. L., F. de la Cruz, R. Eisenbrandt, A. M. Grahm, G. Koraimann, E. Lanka, G. Muth, W. Pansegrau, C. M. Thomas, B. M. Wilkins, and M. Zatyka. (2000). Conjugative-DNA Transfer Processes, p. 87-174. In C. M. Thomas (ed.), The Horizontal Gene Pool. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Zhou, F.; Wang, Y. (2013). Characteristics of Antibiotic Resistance of Airborne *Staphylococcus* Isolated from Metro Stations. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10, 2412-2426.

CAPITULO VI

VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS, PRESENTES EN BIOAEROSOL GENERADOS EN LA ZONA DE HUARA, EN LAGOS DE LA PATAGONIA



Guisella Escalante ^{1,2}; Carla G León ¹; Santiago Mafla ¹; María Angélica Mondaca¹ ; Víctor L Campos ¹. Viabilidad de las bacterias presentes en bioaerosoles generados en la zona de Huara, Chile. Folia Microbiologica (En preparación)

Viabilidad de las bacterias, presentes en bioaerosoles generados en la zona de Huara, en lagos de la Patagonia

Guisella Escalante ^{1,2}; Carla G León ¹; Santiago Mafla ¹; María Angélica Mondaca¹ ; Víctor L Campos ^{1*}

1. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción Casilla postal 160-C, Correo 3, Concepción, Chile.

2. Centro EULA-CHILE, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

*Autor para correspondencia: vcampos@udec.cl, teléfono +56 41 2204118.

Resumen

Desde el punto de vista de la aerodinámica los bioaerosoles pueden ser fácilmente transportados largas distancias en la atmósfera a través de varios procesos y movimientos dinámicos del aire y ser ubicuos en la atmósfera de la Tierra, especialmente en la zona de la troposfera. En consecuencia, dichas partículas posiblemente pueden influenciar el medio ambiente, el clima, la salud pública, y otros a escala regional y global. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la viabilidad de las bacterias obtenidas desde la zona de Huara en lagos de la Patagonia, para lo cual se trabajó con diferentes microcosmos a los cuales se les realizó recuento de células viables, identificación molecular, estudio del metabolismo y análisis molecular del ADNr 16S. Los resultados obtenidos dejan en evidencia la viabilidad de las bacterias de la zona de Huara en aguas de lagos Patagónicos, al observar un aumento constante del número de células viables/ml en el tiempo. Las bacterias identificadas en muestras de arena y bioaerosoles del desierto fueron similares destacándose la presencia, en la mayoría de las muestras, de *Acinetobacter* sp. La actividad metabólica observada es similar entre los microcosmos en estudio y se debe a la presencia de bacterias. De acuerdo a esto podemos señalar que los bioaerosoles llevan bacterias que provienen de la arena y que podrían viajar grandes distancias y depositarse en zonas donde logran ser viables.

Palabras claves

Bioaerosoles, Bacterias transportadas por el aire, Viabilidad bacteriana.

Introducción

El aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. La presencia de uno u otro tipo depende del origen, de la dirección e intensidad de las corrientes de aire y de su capacidad de supervivencia (Griffing 2007). Los bioaerosoles pueden estar presentes en la atmósfera como sólidos (polvo) o como líquidos (condensación y agua), en cualquiera de estas dos fases son un importante vehículo bacteriano (Cosenza 2004).

Desde el punto de vista de la aerodinámica los bioaerosoles pueden ser fácilmente transportados largas distancias en la atmósfera a través de varios procesos y movimientos dinámicos del aire y ser ubicuos en la atmósfera de la Tierra, especialmente en la zona de la Troposfera. En consecuencia, dichas partículas posiblemente pueden influenciar el medio ambiente, el clima, la salud pública, y otros a escala regional y global (Griffin et al. 2001; Prospero et al. 2005; Ariya y Amyot 2004; Lohmann y Feichter 2005; Kanakidou et al. 2005; Sun y Ariya 2006; Fuzzi et al. 2006; Elbert et al. 2007; Möhler et al. 2007).

Junto al suelo hay una capa laminar de aire que impide el fácil paso de microorganismos del suelo a la atmósfera para que esto ocurra se necesita una fuerte corriente de aire que levante polvo del suelo o agua y permita así el paso de diversos microorganismos (De La Rosa et al. 2002; Griffing 2005; Griffing 2007; Hervás et al. 2009). Procesos asociados con el cambio global, tales como la desertificación y cambios en el uso de la tierra, están promoviendo un aumento del contenido de polvo en la atmósfera que se ha visto particularmente acentuado en las últimas décadas (Próspero y Lamb 2003; Moulin y Chiapello 2006; Neff et al. 2008).

En Chile, los remolinos de polvo, son producidos con mayor frecuencia en áreas desérticas donde las superficies son calentadas por el sol, y luego de formarse en la superficie, ascienden, como en el caso del Desierto de Atacama, en la zona de Huara, a 30 kilómetros al norte de Pozo Almonte en la I región, se han llegado a contar más de 70 remolinos simultáneos (Greeley et al 2010; Kurgansky et al. 2010).

El rol del ingreso de bioaerosoles a ecosistemas de lagos de zonas remotas es un proceso potencialmente importante pero aún muy poco explorado (Skidmore et al. 2000; Toom-Saunty y Barrie 2002; Amato et al. 2007b; Zhang et al. 2003).

Los lagos Patagónicos son considerados remotos y prístinos con ecosistemas que carecen de influencia antropogénica local pero con eventos recurrentes de deposición de partículas. Estos ecosistemas responden rápidamente a las perturbaciones ambientales y son indicadores sensibles del cambio global (Catalan et al. 2006). Es muy poco lo que se sabe acerca de la migración de microorganismos mediante el fenómeno de dispersión y posterior deposición de bioaerosoles por lo que es importante estudiar las comunidades microbianas presentes en los bioaerosoles y su función en aguas de lagos Patagónicos, ya que así mejoraría la comprensión de estos ecosistemas y como responden frente a la influencia de agentes externos (Ranjard et al. 2000).

Por lo mencionado el objetivo del presente trabajo fue determinar la viabilidad de las bacterias obtenidas desde la zona de Huara, desierto de Atacama, en aguas de lagos de la Patagonia.

Materiales y Métodos

Toma de Muestras

Bioaerosoles. Las muestras de bioaerosoles se tomaron en la zona de Huara, a 30 kilómetros al norte de Pozo Almonte, I región de Chile (19 ° 59 25.6 "S 069 ° 44' 24.5" O). Se obtuvieron utilizando la técnica de filtrado simple para colectar pequeñas

partículas en suspensión desde una altura de 2.5 metros, con una bomba de vacío portátil (Tactical Air Sampler) con un flujo de aire de 5 litros por minuto (Escalante et al. 2014).

Los filtros de membrana, con las muestras de bioaerosoles, fueron retirados de la bomba de vacío, y colocados en bolsas estériles, sellados con cinta adhesiva y refrigerados para su posterior análisis.

Se utilizó como control un filtro de membrana adicional que se colocó en la bomba de vacío y se dejó reposar sin quitar la tapa ni encender la bomba.

Arena. Muestras de arena se tomaron desde la zona de Huara, utilizando bolsas plásticas y palas de tamaño pequeño, previamente esterilizadas. En una cámara de flujo laminar y en condiciones estériles se tamizó la arena. Las fracciones de polvo de la arena con un tamaño menor a 0,63um fueron utilizadas para los diferentes experimentos.

Agua. Las muestras de agua fueron tomadas en los lagos: Alto (46 ° 11 '17.34 "S 72 ° 19' 45.04" W), Verde (46 ° 9 '35.83 "S 72 ° 19' 8.58" W) y Esponja (45 ° 9 '53.2794 "S 72 ° 8' 43.7994" W), ubicados cerca de la ciudad de Coyhaique, Aysén. Para esto las muestras de agua superficial de los lagos (primeros 30 cm aproximadamente) se tomaron utilizando botellas de vidrio estéril de 5 litros y fueron trasladados refrigerados al laboratorio.

Experimento en Microcosmos

Los experimentos en microcosmos se realizaron, por duplicado, el volumen total de las muestras de agua, de cada uno de los lagos en estudio, se filtraron dos veces a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 um con la finalidad de eliminar los microorganismos presentes, y se mantuvo a 4 ° C para su posterior uso. El agua filtrada fue luego esterilizada, por autoclave durante 30 minutos a 120°C para eliminar

cualquier microorganismo remanente. Se trabajó con cuatro matraces, con 250 ml de agua cada uno. El microcosmos A se le agregó una concentración final de 8 mg l^{-1} de partículas de arena con una fracción de tamaño menor a $0,63 \text{ um}$, con la finalidad de aproximar la dosis diaria colectada durante la ocurrencia de eventos de polvo y así estar dentro del rango descrito en la literatura para experimentos similares (Reche et al. 2009). Al microcosmos B se le colocó 1/6 del filtro con bioaerosoles depositados en ellos. El microcosmos C, sirvió como control y consistió en agregar al agua, una fuente de carbono orgánico (acetato de sodio a una concentración final de 1 mM), nitrógeno (casamino ácidos a una concentración final de $0,04\% \text{ w/v}$) y fósforo (KH_2PO_4 a una concentración final 10 uM). La adición de nutrientes sirvió para chequear la presencia de bacterias autóctonas presentes después del filtrado y detectar bacterias presentes producto de la contaminación por la manipulación de las muestras.

Adicionalmente se utilizó un último matraz “Microcosmos D” con agua de cada lago respectivamente sin esterilizar, esto con el objetivo de tener un Control positivo de crecimiento y a la vez sirvió para comparar los resultados del perfil metabólico.

Cada microcosmos fue sonificado durante 5 min, utilizando un ultrasonificador con baño de agua marca Branson Jp-020 con el objetivo de disolver las partículas de polvo y se incubaron a 10°C en oscuridad durante 96 h.

Se tomaron muestras de cada uno de los matraces (5 ml cada vez) diariamente durante cinco días, para realizar el recuento de células viables. El volumen total restante, al tiempo final, fue tomado para realizar la extracción y amplificación del ADN y posterior análisis por DGGE.

Recuento de células viables

Se tomó aproximadamente 5 ml de cada muestra por 5 días y se procedió a realizar las diluciones respectivas, Esta técnica se basa en contar las colonias de microorganismos que se desarrollan después de inocular , por diseminación en superficie, el agar R₂A con la muestra de cada microcosmos.

Cuando la muestra se diluye el cálculo del resultado se realiza contando las colonias en aquellas placas que tengan entre 30 y 300, se promedia y se multiplica por el factor de dilución. Los resultados se expresan en UFC por ml, de acuerdo a lo señalado por Leboffe y Pierce (2011).

Extracción directa del ADN desde las muestras de microcosmos

El ADN (de cada una de las muestras) fue extraído utilizando el kit de extracción, UltraClean soil DNA (MO BIO Laboratorios, Inc. Solana Beach, California, EE.UU.). El ADN se disolvió en un buffer de Tris-HCl 10 mM y se almacenó a -18 ° C hasta su posterior utilización.

Amplificación de ADNr 16S de las muestras de microcosmos

El ADN extraído fue utilizado como templado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó primers universales: Eub9-27F y Eub1542R para amplificar el ADNr 16S de Eubacterias. Las condiciones para las reacciones se realizaron de acuerdo a lo señalado por Dorador et al. (2007).

Análisis por DGGE de las muestras de microcosmos

Para los análisis por DGGE los productos de PCR, obtenidos anteriormente se utilizaron como templado para la amplificación con primers específicos para la región V3 del ADN ribosomal (p1-GC clamp (341f) 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCG-3'-GC(40 pb) y p2(534r) 5'- ATTACCGCGGCTGG-3') (Escalante et al 2014). Un sistema DCode (Bio-Rad, Hercules, CA) fue utilizado para revelar los productos de PCR. Los geles contenían 8% acrilamida (BIO RAD Laboratorios Inc.) y 40-70% de gradiente de Urea/Formamida (BIO RAD Laboratories Inc.). Los productos fueron purificados con el Kit de purificación Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega, USA), y secuenciados por Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, Korea). Las

secuencias fueron comparadas con la información del GenBank usando BLAST (Altschul et al. 2000).

Perfil metabólico de las comunidades bacterianas presentes en los diferentes microcosmos

La diversidad de fuentes de carbonos utilizables por las comunidades bacterianas presentes en los experimentos en microcosmos, fueron determinadas mediante la utilización del sistema Biolog Ecoplatetm (Biolog Inc., CA, USA). Cada pocillo fue inoculado con 100 µl de una dilución de cada muestra a una concentración final de 1×10^5 células por ml^{-1} . Las microplacas se incubaron a 10°C. La formación de color se detectó visualmente y al mismo tiempo se midió la densidad óptica a 590 nm en un lector de microplaca, después de 24h, 48h, 72h y 96h de incubación.

La actividad microbiana (AWCD) en cada microplaca, se expresó como el desarrollo de color en los pocillos de la siguiente manera: $\text{AWCD} = \sum \text{OD}_i / 31$

En donde OD_i es el valor de densidad óptica de cada pocillo medida a 590 nm (Gomez et al. 2006). Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado y como control negativo se utilizó agua estéril.

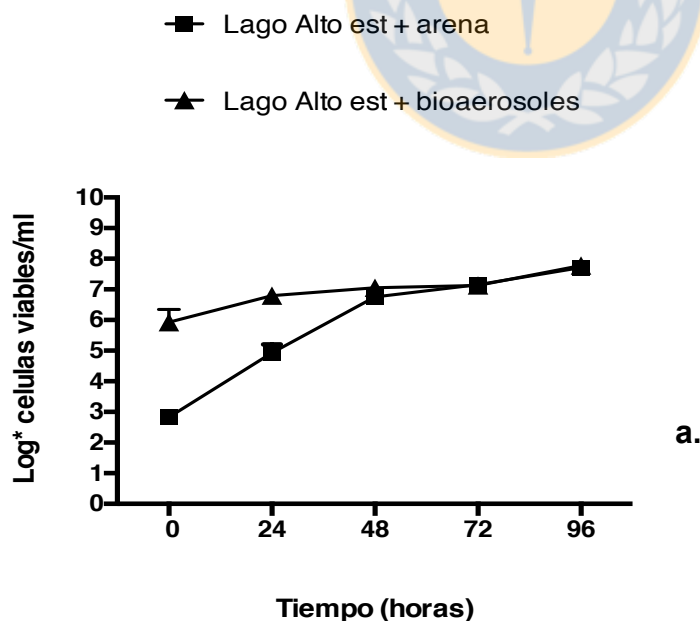
Resultados y Discusión

No se observó crecimiento en ninguna de las muestras control de microcosmos (C y D), lo cual confirmaría que los resultados obtenidos son el reflejo de la presencia y actividad de las bacterias presentes en las muestras de arena o de bioaerosoles.

En los microcosmos A y B, para cada uno de los lagos, se observó crecimiento bacteriano no observando ninguna diferencia significativa entre los lagos en estudio, a pesar de provenir desde diferentes ubicaciones cada uno. A las 24 hrs de incubación se observa una respuesta exponencial en cada muestra y a partir de ahí un crecimiento que va en aumento a lo largo de las horas (Fig. 1 a, b y c). Estudios similares como el de Hervàs et al (2009) señalan en sus resultados que no se produjo

diferencias significativas en el número final de células bacterianas producidas entre las diferentes aguas de lagos utilizados, los cuales tienen características similares a los usados en este estudio. Incluso en sus estudios con microcosmos al igual que en los resultados obtenidos en este trabajo no se observaron diferencia significativa entre los dos microcosmos (arena y bioaerosoles) en estudio para cada uno de los lagos

Los lagos Patagónicos así como los de Montaña, mencionados en diferentes investigaciones, son ecosistemas a menudo considerados prístinos y remotos en gran parte no afectados por factores antropogénicos locales debido a su inaccesibilidad. Por esta razón, se ha propuesto que este tipo de lagos pueden servir como centinelas de algún tipo de cambio global (Catalán et al. 2006). El primer colector / interceptor natural de estas depositaciones atmosféricas es el neuston, la comunidad biológica que habita en la superficie de la microcapa hidrofóbica localizada dentro de los primeros milímetros de la interfaz aire-agua (Hervàs y Casamayor 2009). Por lo tanto, idealmente el neuston debe capturar los efectos remotos que la deposición de polvo de larga distancia puede causar.



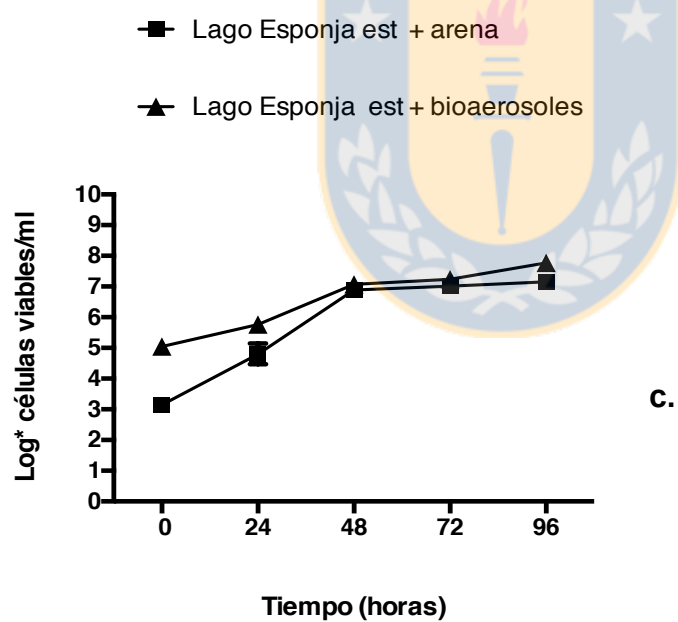
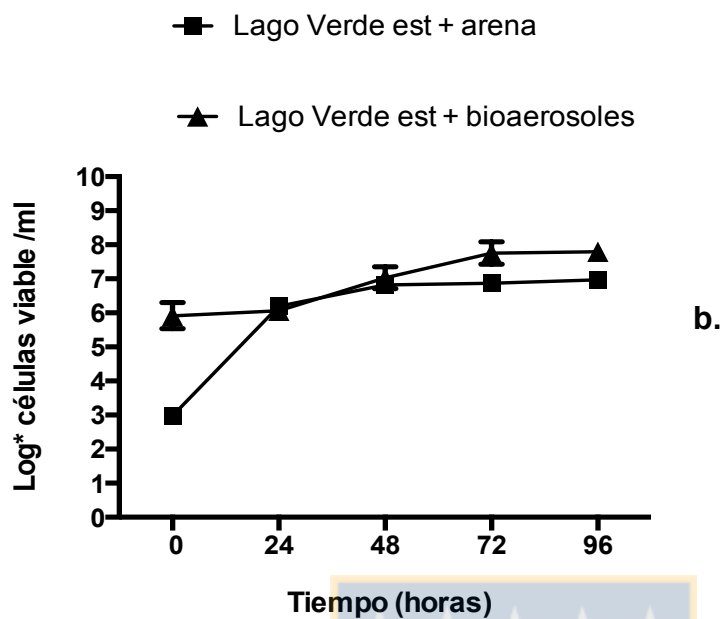


Fig. 1. a,b,c Recuento de células viables en muestras de microcosmos A (lago+arena) y B (lago + bioaerosoles) de cada uno de los Lagos estudiados

Es un hecho bien conocido que las bacterias cultivables parecen constituir sólo una pequeña fracción de los recuentos de células totales en muestras de aire (menos de 1%,) Griffin et al. 2001). Sin embargo, estudios a nivel de ADN puede detectar tanto las bacterias vivas que no pueden crecer en placas de agar, sino también los microorganismos muertos unidos a partículas de polvo (Maron et al. 2005). El diseño experimental llevado a cabo en los microcosmos facilitó la activación de las células y el crecimiento en condiciones más cerca de la oligotrofia prevaleciente en los lagos en estudio. Sin embargo, las implicancias ecológicas deben ser cuidadosamente extrapolados a partir de estos experimentos porque los posibles competidores locales y depredadores fueron excluidos de los microcosmos en este estudio. Los resultados de los experimentos llevados a cabo indican un potencial para la inmigración de taxones específicos, pero queda por examinar el destino de estas bacterias in situ a una escala más correcta y con el uso combinado de otras herramientas moleculares.

Las secuencias del ARNr 16S de las bacterias obtenidas de los microcosmos pertenecen a grupos taxonómicos que normalmente se encuentran en ecosistemas de agua dulce, es decir, *alfa*, *beta* y *gammaproteobacteria*. En la mayoría de los casos, las bandas cortadas y secuenciadas a partir de los geles de DGGE pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria*. Estas son una clase taxonómica que incluye diversas especies de importancia médica, ecológica y científica. De acuerdo a los resultados se podría pensar que las bacterias provenientes desde la arena y el aire, en los microcosmos A y B se adaptaron bien a las condiciones oligotróficas, que se desarrollaron en los tratamientos. Cabe además señalar que no se han detectado secuencias de bacterias en el microcosmos C, que funcionaba como control negativo para el crecimiento (Tabla 1,2,3).

El polvo anualmente moviliza a la atmósfera más de mil millones de toneladas métricas (Moulin et al. 2006) lo que intercambia activamente material biológico entre los ecosistemas a través de los continentes.

Este número representa sólo una pequeña porción de los números totales de bacterias estimados (Whitman et al. 1998), el transporte atmosférico probablemente desempeña un papel clave para la dispersión bacteriana global.

Estudios similares han reportado la presencia de *Actinobacteria*, *Bacillus* y otros Firmicutes, también se ha informado la presencia de *alfa*, *beta* y *Gammaproteobacteria* (Radosevich et al. 2002; Wilson et al. 2002; Maron et al. 2005; Fierer et al. 2008). Las bacterias asociadas al polvo, probablemente se derivan directamente de los suelos cuando el primero se moviliza por los vientos. Esto se demuestra con los resultados obtenidos en los experimentos con microcosmos, donde la mayoría de las bacterias aisladas desde el microcosmos B, que contenía las muestras de aire, también se aislaron en el A. Pero también algunas bacterias pueden ser inyectadas en las masas de aire con polvo a partir de fuentes locales (incluyendo el agua de mar o la vegetación) por la advección y mezcla vertical de las nubes convectivas detectadas en los suelos pero si estaban relacionadas cercanamente con bacterias presentes en el océano y en las plantas (Hervàs 2009).

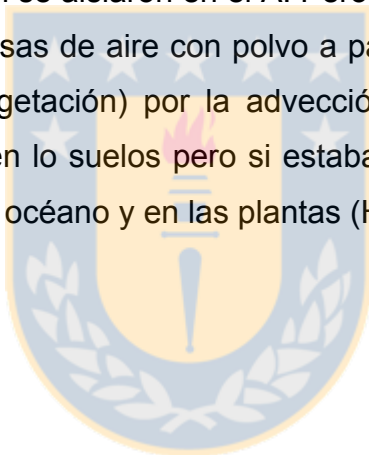


Tabla 1. Análisis de las secuencias del ADNr 16S obtenidos por DGGE en muestras de Microcosmos A y B del Lago Alto

Microcosmos A*		Microcosmos B**	
Genero/ Especie	Clase	Genero/Especie	Clase
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacilli</i>
<i>Uncultured beta proteobacterium</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Uncultured beta proteobacterium</i>	<i>Betaproteobacteria</i>
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	<i>Betaproteobacteria</i>
<i>Thiorhodospira sibirica</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Thiorhodospira sibirica</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Acinetobacter sp</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Betaproteobacteria</i>
<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Azospirillum sp</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>		

*microcosmos A :lago est +arena;** microcosmos B: lago est + bioaerosoles

Tabla 2. Análisis de las secuencias del ADNr 16S obtenidos por DGGE en muestras de Microcosmos Microcosmos A y B del Lago Verde

Microcosmos A*		Microcosmos B**	
Genero/Especie	Clase	Genero/Especie	Clase
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacilli</i>
<i>Azospirillum zeae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillum zeae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Bacilli</i>
		<i>Uncultured Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>
		<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
		<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>

* microcosmos A :lago est +arena;** microcosmos B: lago est + bioaerosoles

Tabla 3. Análisis de las secuencias del ADNr 16S obtenidos por DGGE en muestras de Microcosmos A y B del Lago Esponja

Microcosmos A*		Microcosmos B**	
Genero/Especie	Clase	Genero/Especies	Clase
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacilli</i>
<i>Azospirillum zeae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillum zeae</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>
<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Bacilli</i>
<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>		
<i>Azospirillum sp.</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>		

*microcosmos A :lago est +arena;** microcosmos B: lago est + bioaerosoles

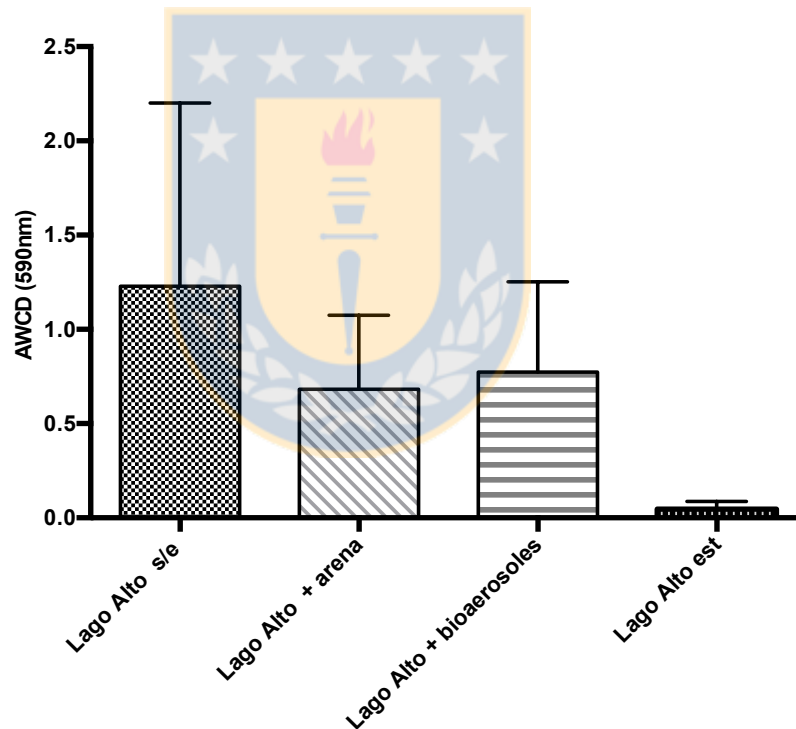
Los resultados muestran la presencia, en la mayoría de los microcosmos, de la bacteria *Acinetobacter sp.* al igual que en trabajos similares como el de Hervàs y Casamayor (2009) o el de Reche et al. (2009), donde se señala que esta es una bacteria viable transportada por el aire y con el potencial de desarrollarse en aguas de lagos. Sin embargo esta bacteria, requiere cambios en las condiciones de los lagos in situ para desarrollarse exitosamente y así poder competir con las bacterias locales. La colonización exitosa en estos ambientes para una bacteria es un tema complejo ya que existen varios factores limitantes, como la competencia con bacterias autóctonas,

la temperatura o la composición iónica y la resistencia a los depredadores, entre otros (Pernthaler y Amann 2005 y Reche et al. 2009). El potencial de desarrollo en lagos oligotróficos es ciertamente grande, y no podemos descartar el éxito futuro, ya que estos ecosistemas frágiles son biológicamente reactivos a los cambios globales en la temperatura o eutrofización (Psenner 1999). La presencia de *Acinetobacter* y *Sphingomonas*, en resultados anteriores y en el presente ilustran el potencial de supervivencia y las estrategias de dispersión de microorganismos patógenos.

El genero Acinetobacter en este trabajo agrupa bacterias oportunistas altamente patógenas y resistentes para el hombre (Bergogne-Berezin y Towner 1996) por lo tanto resulta razonable suponer que algunas especies de patógenos pueden ser transportados por el aire y ser viables a través de grandes distancias, protegidos por los mismos mecanismos que protegen a las bacterias no patógenas. De hecho patógenos humanos oportunistas y patógenos de vegetales y animales son muy comunes en las muestras de polvo en el aire (Griffin et al. 2001; Kellogg et al. 2004).

La caracterización metabólica fue realizada con Biolog Ecoplate™ (Biolog®) (Garland y Mills 1991). Las microplacas fueron incubadas a 10°C y la densidad óptica ($\lambda = 590$ nm) de cada pocillo fue determinada durante 96 horas con intervalos de 24 horas (Garland 1996), usando el lector de microplacas (Epoch™ de BIOTEK®). Los resultados obtenidos en Biolog Ecoplate™ fueron analizados observando el índice de desarrollo de color en los pocillos de las microplacas (AWCD) Fig 2, índice de Shanon-Weaver (H') para ver la diversidad, el índice de Enriquecimiento (S) y el índice de Evanness (E) (Gomez et al. 2006). Los resultados de AWCD, H' y E fueron analizados a través del test T de Student usando el software MINITAB® (versión 15, USA). Las fuentes de carbono fueron divididas según categorías como; carbohidratos (N=10), ácidos carboxílicos (N=9), aminoácidos (N=6), polímeros (N=4) y aminas (N=2) (Garland y Mills 1991). Luego, se obtuvo el índice AWCD, para cada uno durante el tiempo y se realizó una gráfica de barra de los AWCD de las distintas fuentes a las 96 horas (Fig. 3) usando el software GraphPad Prism 5®. De los resultados obtenidos podemos observar que existe diferencia significativa entre los microcosmos A y B comparado con el microcosmos D ($p < 0.005$) en cada uno de los

tres lagos. El microcosmos D, como se señala en materiales y métodos es agua de cada lago sin ningún tratamiento adicional ni proceso de esterilización y sirvió como control. Además también se observó de acuerdo a los índices de AWCD que no existe diferencia significativa entre los microcosmos A y B de cada lago. Este resultado concuerda con lo esperado ya que en el microcosmos A, se utilizó muestras de arena de la zona de Huara y en el Microcosmos B se utilizó muestras de bioaerosoles obtenido por filtración en discos de membrana desde la misma zona.



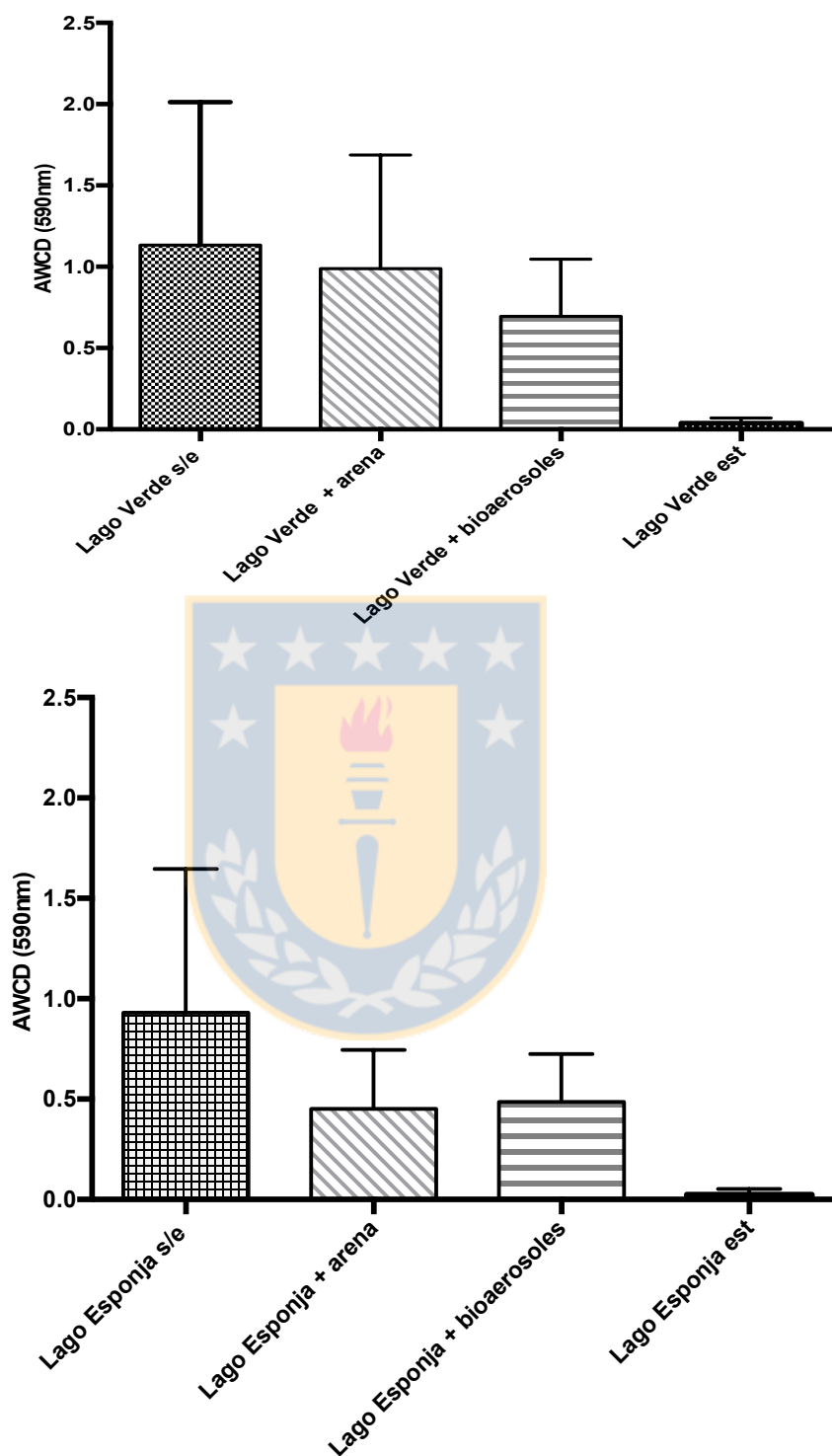


Fig. 2. Actividad metabólica calculada para el microcosmos A y B de los lagos Alto, Verde y Esponja. Las barras de error representan un error estándar. Microcosmos A :lago est +arena; microcosmos B: lago est + bioaerosoles.

Ahora bien en cuanto a los resultados de utilización de diversas fuentes de carbono podemos decir que no existió diferencia significativa ($p > 0,005$) en la actividad metabólica del microcosmos A y B de cada una de las fuentes de carbono tanto para el lago Alto como para el Esponja, al mismo tiempo se observa que si existe diferencia ($p < 0,005$) entre los microcosmos A y B comparado con el D en ambos lagos mencionados (Fig. 3). Ahora algo muy distinto se observa en el Lago Verde donde si se observa diferencia significativa ($p < 0,005$) entre el microcosmos A y B, observándose que las bacterias presentes en la muestra de arena utilizan las distintas fuentes de carbono de forma similar a como lo hacen las bacterias autóctonas de dicho lago (microcosmos D). Esto podría deberse a que justo la arena incorporada al matraz además de llevar bacterias lleva consigo diversos componentes como algunas sales o elementos como el fósforo en mayor cantidad a lo que tenían las otras dos muestras de arena de los otros lagos. Por lo tanto sería conveniente realizar análisis de los componentes químicos que tiene la arena del desierto utilizada.

Desde hace varios años se ha estudiado y explorado el suministro de nutrientes (nitrógeno y fósforo, entre otros) que las muestras de polvo, tomadas desde el aire, acarrear a los ecosistemas terrestres y oceánicas (Herut et al. 2002; Morales-Baquero et al. 2006)

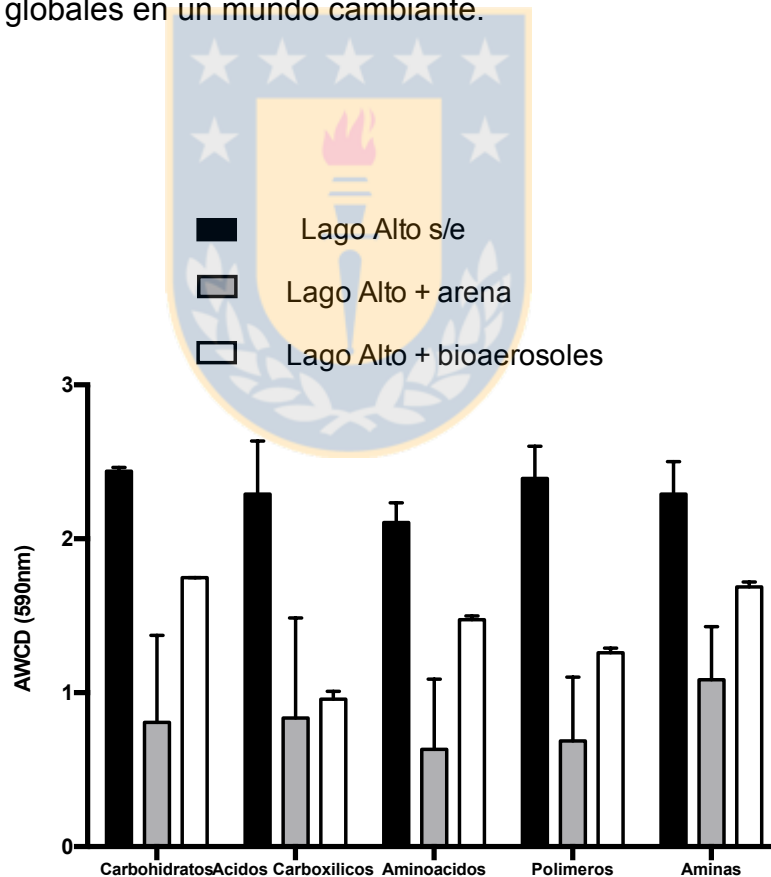
Se ha observado que en los lagos alpinos altamente influenciados por los brotes de polvo del Sahara, La depositación atmosférica estimula constantemente el crecimiento bacteriano probablemente por los inputs de fósforo (Mladenov N et al. 2008) resultados similares se han encontrado en cuatro lagos Pirineos tras el suministro de polvo. Además, el polvo en el aire proveniente del desierto también contiene carbono orgánico (Eglinton et al. 2002.; Usher et al. 2003) que podría ser utilizado como fuente de carbono para las bacterias heterótrofas.

Usher et al. 2003 no encontró diferencias significativas en el crecimiento bacteriano entre el polvo del desierto y el polvo en el aire después de un viaje realizado por la troposfera que hubiese modificado los componentes orgánicos. En conjunto, parece que el polvo básicamente suministraría bacterias con limitados nutrientes inorgánicos

(principalmente fósforo y nitrógeno) (Mladenov et al. 2008) para que se utilice el carbono orgánico disponible y presente en estos lagos.

Los Lagos de alta montaña se encuentran entre los ecosistemas con mayores similitudes de todo el planeta y con un alto nivel de bacterias cosmopolitas (Sommaruga y Casamayor 2009), que ofrece oportunidades de investigación más allá de lo que se podría esperar de su importancia cuantitativa en la Tierra (Catalán et al. 2006).

Este tipo de lagos parecen ser sistemas de modelos adecuados para explorar la dispersión y los mecanismos de supervivencia así como sus habilidades de colonización, la competencia y las adaptaciones locales de microorganismos en el aire a escalas globales en un mundo cambiante.



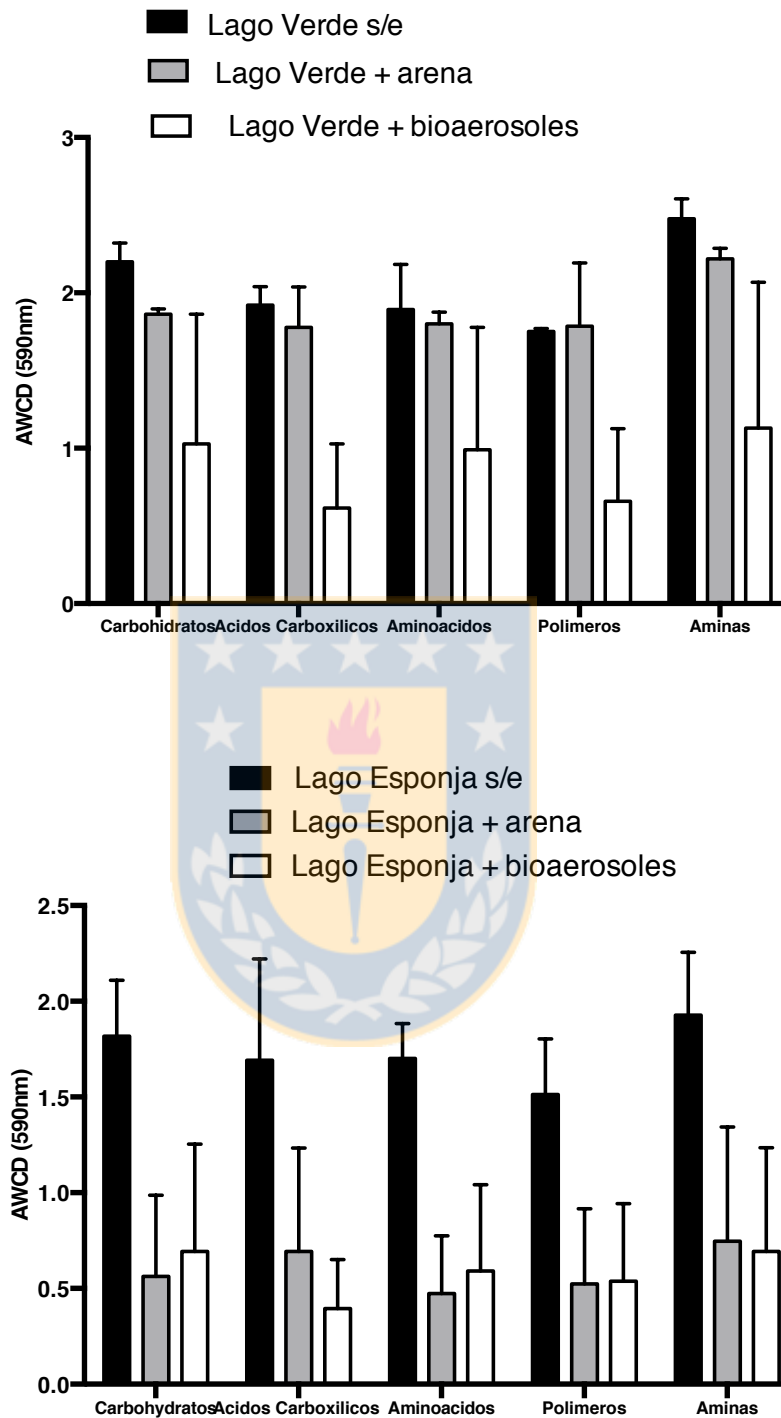


Fig. 3 Actividad metabólica calculada a partir de los valores de absorbancia de Biolog Ecoplate para los tres microcosmos (A,B y D) de cada lago después de 96 h de incubación. El sustrato se dividieron en cinco categorías; Hidratos de carbono (n = 10) aminas (n = 2) aminoácidos (n = 6) ácidos carboxílicos (n = 9) y polímeros (n = 4)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son los primeros resultados preliminares de viabilidad de bacterias de bioaerosoles en zonas remotas. La viabilidad queda en evidencia al observar un aumento constante del número de células/ ml a lo largo de las horas durante el recuento de células viables. Las bacterias identificadas en muestras de arena y bioaerosoles del desierto fueron similares destacándose la presencia, en la mayoría de los microcosmos, de la bacteria *Acinetobacter sp.* esta es una bacteria viable transportada por el aire y con el potencial de desarrollarse en aguas de lagos y además agrupa bacterias oportunistas altamente patógenas y resistentes para el hombre (Bergogne-Berezin y Towner 1996), La actividad metabólica observada es similar entre ambos microcosmos en estudio (con arena y con bioaerosoles) y se debe a la presencia de bacterias en ambos tipos de muestras.

De acuerdo a esto podemos señalar que los bioaerosoles llevan bacterias que provienen de la arena, y pueden viajar largas distancias y depositarse en zonas remotas donde logran ser viables, alterando de alguna forma el ecosistema donde se depositan, de acuerdo al modelo de Niznanki (Fig. 4).

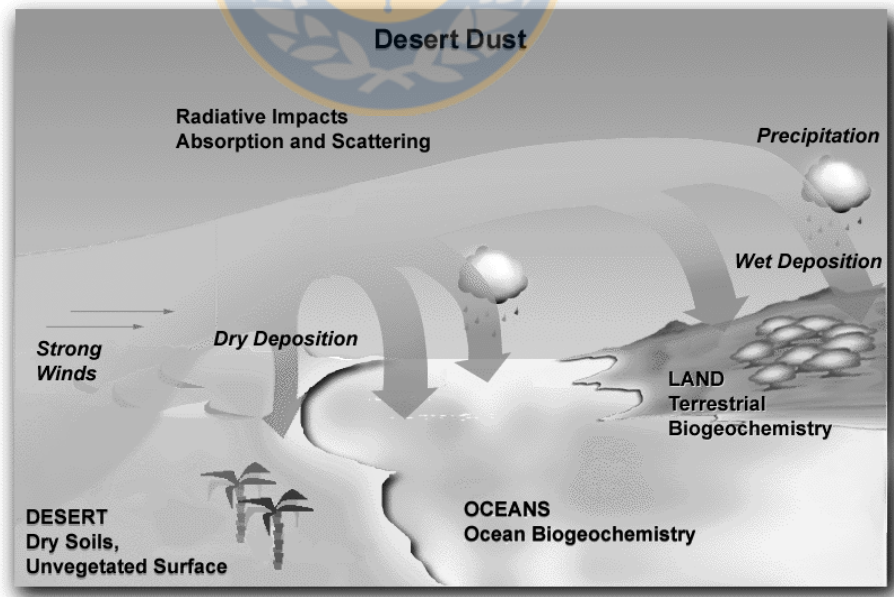


Fig. 4. Modelo de Dispersión de bacterias desde la arena al aire mediante bioaerosoles y su posible depositación a distancias largas desde su origen. Modificado de Niznansky, B. National Weather Service Forecast Office. (2010)

Referencias

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.

Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., Delort, A (2007b). An important oceanic source of microorganisms for cloud water at Puy de Dôme (France). *Atmospheric Environment*, 41: 8253 - 8263.

Ariya, P.A., Amyot, M. (2004). Bioaerosols: Impact on physics and chemistry of the atmosphere, *Atmospheric Environment*, 38(8), 1231-1233.

Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*. Apr; 9(2):148-65.

Catalan, J., Camarero, L., Felip, M., Pla, S., Ventura, M., Buchaca, T., Bartumeus, F., Mendoza, G., Miró, A., Casamayor, EO., Medina-Sánchez, JM., Bacardit, M., Altuna, M., Bartrons, M., Díaz de Quijano, D. (2006). High mountain lakes: extreme habitats and witnesses of environmental changes. *Limnetica* 25: 551–584.

Cosenza, G. (2004). Enumeration of total airborne bacteria, yeast and mold contaminants and identification of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. in a beef and pork slaughter facility. A dissertation presented to the graduate school of the university of florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy. University of Florida.

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

Dorador, C., Castillo, G., Witzel, K-P., & Vila, I. (2007) Bacterial diversity in the sediments of a temperate artificial lake, Rapel reservoir. *Revista Chilena de Historia Natural*, 80: 213-224.

Eglinton, T.I., Eglinton, G., Dupont, L., Sholkovitz, E.R., Montluçon, D., Reddy, C.M. (2002). Composition, age and provenance of organic matter in NW African dust over the Atlantic Ocean. *Geochemistry, Geophysics, Geosistem.* 3 (8).

Elbert , W., Taylor, PE., Andreae, MO., Pöschl, U. (2007). Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharge spores, carbohydrates, and inorganic ions. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7:4569–4588.

Escalante, G., León, C., Giacomozzi, B., Guzmán, V., Mondaca, M.A., Urrutia, R., Smith, C., Campos, VL. (2014). Unusual pathogenic bacterium isolated from microbial communities of bioaerosols at chilean Patagonian lakes. *Aerobiologia*, 30, 3, 323-331.

Fierer, N., Liu, Z., Rodríguez-Hernandez, M., Knight, R., Henn, M., Hernandez, M. (2008). Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 74,1, 200–207.

Fuzzi, S., Andreae, MO., Huebert, BJ., Kulmala, M, Bond, TC., Boy, M., Doherty, SJ., Guenther, A., Kanakidou, M., Kawamura, K., Kerminen, V.M., Lohmann, U., Russell,

L.M. Pöschl, U. (2006). Critical assessment of the current state of scientific knowledge, terminology, and research needs concerning the role of organic aerosols in the atmosphere, climate, and global change. *Atmospheric Chemistry and Physics* 6, 2017-2038.

Garland, J.L. (1996). Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization., *Soil, Biology, Biochemistry*, 28, 213–221.

Garland, J.L., Mills, A.L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied Environmental Microbiology* 57, 2351–2359.

Gomez,E., Ferreras, L., Toresani S. (2006): Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology*, 97, 1484–1489.

Greeley, R., Waller, D. A., Cabrol, N. A., Landis, G.A., Lemmon, M. T., Neakrase, L.D.V., Pendleton, M., Hoer, S., Thompson, D., Whelley, P.L. (2010), Gusev Crater, Mars: Observations of three dust devil seasons, *Journal of Geophysical Research*, doi:10.1029/2010JE003608.

Griffin D., Garrison V., Herman J., y Shinn E. (2001). African desert dust in the Caribbean atmosphere: Microbiology and public health *Aerobiologia*, 17, 203–213.

Griffin, D.W. (2005). Clouds of Desert Dust and Microbiology: A Mechanism of Global Dispersion. *Microbiology Today*, November.

Griffin, D.W. (2007). Atmospheric Movement of Microorganisms in Clouds of Desert Dust and Implications for Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 3, 459–477.

Herut, B., Collier, R., Krom, M.D. (2002). The role of dust in supplying nitrogen and phosphorus to the South East Mediterranean. *Limnology and Oceanography*, 47, 870–878.

Hervás, A., Camarero, L., Reche, I., Casamayor, E.O. (2009). Environmental Microbiology. Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe, 11, 6, 1612–1623.

Hervás, A., Casamayor, E.O. (2009). High similarity between bacterioneuston and airborne bacterial community compositions in a high mountain lake area *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 219–228.

Kanakidou, M., Seinfeld, J.H., Pandis, S.N., Barnes, I., Dentener, F.J., Nielsen, C.J., Swietlicki, E., Putaud, J.P., Balkanski, Y., Fuzzi, S., Horth, J., Mootgat, G.K., Winterhalter, R., Myhre, C.E.L., Tsigaridis, K., Vignati, E., Stephanou, E.G., Wilson, J. (2005) Organic aerosol and global climate modeling: a review. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 5, 1053–1123.

Kellogg, C.A., Griffin D.W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 638.

Kurgansky, M. V., A. Montecinos, V. Villagran, Metzger, SM. (2010). Micro-meteorological conditions for dust devil occurrence in the Atacama Desert. *Boundary Layer Meteorology*, doi 10.1007/s10546-010-9549-1.

Leboffe, M.J, Pierce, B.A. (2011). *Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory* (4th Edition)

Lohmann, U., Feicher J. (2005) Global indirect aerosol effects: a review. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 5, 715–735.

Maron, P.A., Lejon, D.P.H., Carhalho, E., Bizet, K., Lemanceau, P., Ranjard, L., Mougél, C (2005). Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial communities by DNA fingerprinting. *Atmospheric Environment* 39, 3687–3695.

Mladenov, N., Pulido-Villena, E., Morales-Baquero, R., Ortega-Retuerta, E., Sommaruga, R., Reche I. (2008). Spatio-temporal drivers of dissolved organic matter in high mountain lakes: the role of Saharan dust inputs and bacterial activity. *Journal of Geophysical Research* (special section on high mountain lakes), 113.

Möhler, O., Demott ,P.J., Vali, G., Levin, Z. (2007). Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences* 4:1059–1071.

Morales-Baquero, R., Pulido-Villena, E., Romera, O., Ortega-Retuerta, E., Conde-Porcuna, JM., Pérez-Martínez, C., Reche I. (2006). Significance of atmospheric deposition to freshwater ecosystems in the southern Iberian Peninsula, *Limnetica*, 25,1-2,171-180.

Moulin, C., Chiapello I. (2006). Impact of human-induced desertification on the intensification of Sahel dust emission and export over the last decades. *Geophysical Research letters*, 33.

Neff, JC., Ballantyne, AP., Farmer, GL., Mahowalda, NM., Conroy, JL., Landry, CC., Verpeck, JT., Painterio, TH., Lawrence, CR., Reynolds RL.(2008). Increasing eolian dust deposition in the Western United States linked to human activity. *Nature Geoscience*, 1, 3, 189-195.

Olaya, D & Perez, F. (2006) Caracterización cualitativa -cuantitativa de bioaerosoles relacionados con factores meteorológicos y material particulado en puente aranda Bogotá d.C. Tesis para optar al título de Ingeniero Ambiental y Sanitario
Facultad de ingeniería Ambiental y Sanitaria, BOGOTÁ D.C.

Pernthaler, J., Amann, R. (2005). Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69:440-461.

Prospero, J.M., Blades, E., Mathison, G., Naidu, R. (2005) Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, 1, 1–19.

Psenner, R. (1999) Living in a dusty world: airborne dust as a key factor for alpine lakes. *Water Air Soil Pollutants*, 112, 217–227.

Radosevich, J.L., Wilson, W.J., Shinn, J.H., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L. (2002) Development of a high-volume aerosol collection system for the identification of air-borne microorganisms. *Letters Applied Microbiology*, 34(3):162-7.

Ranjard, L., Poly, F. and Nazaret, S. (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151, 1–11.

Reche, I., Ortega-Retuerta, E., Romera, O., Pulido-Villena, E., Morales-Baquero, R., Casamayor, E.O. (2009). Effect of Saharan dust inputs on bacterial activity and community composition in Mediterranean lakes and reservoirs *Limnology and Oceanography*. 54(3), 869–879.

Redford, A.J., Fierer, N. (2009). Bacterial succession on the leaf surface: a novel system for studying successional dynamics. *Microbial Ecology*, 58: 189-198.

Skidmore, M.L., Foght, J.M., and Sharp, M.J. (2000). Microbial life beneath a high Arctic glacier, *Applied Environmental Microbiology*, 66, 3214–3220.

Sommaruga, R., Casamayor E. (2009). Bacterial ‘cosmopolitanism’ and importance of local environmental factors for community composition in remote high-altitude lakes *Freshwater Biology*. 54, 994–1005.

Sun, J., Ariya, P.A. (2006). Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review. *Atmospheric Environment*. 40,795.

Toom-Sauntry, D., Barrie, L.A. (2002). Chemical composition of snowfall in the high Arctic: 1990–1994, *Atmospheric Environment*, 36, 2683–2693.

Usher, C. R., Michel, A. E., and Grassian, V. H. (2003). Reactions on mineral dust, *Chemical Reviews*, 103, 4883–4939.

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.

Wilson J. (2005). Organic aerosol and global climate modeling: a review. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 5:1053–1123.

Zhang, X.Y., Gong, S.L., Zhao, T.L., Arimoto, R., Wang, Y. Q., Zhou ZJ. (2003). Sources of Asian dust and role of climate change versus desertification in Asian dust emission. *Journal of Geophysical Research Letters*, 30: 2272.

CAPITULO VII



Una gran variedad de organismos que cambian su localización geográfica durante su ciclo de vida, lo hacen a través de la atmósfera. Por tal motivo, las partículas biológicas están siempre presentes en dicho ambiente, aunque su número y viabilidad cambien con las horas del día, las condiciones del tiempo, las estaciones del año y su ubicación geográfica.

La atmósfera, en general, no es considerada un hábitat para los microorganismos, ya que sólo algunos de ellos son capaces de reproducirse allí. (De la Rosa et al. 2002) Sin embargo, su presencia en la atmósfera tiene gran relevancia desde el punto de vista ecológico, por el grado de dispersión que pueden alcanzar y que difícilmente lograrían, en su hábitat primario (terrestre o acuático) (De la Rosa et al. 2002)

La mayoría de las bacterias que entran a la atmósfera provienen de fuentes naturales como la vegetación, el suelo y los cuerpos de agua, y en menor proporción de las actividades antropogénicas, su supervivencia y distribución están moduladas por factores biológicos, meteorológicos (como el viento, la radiación, solar, la temperatura, la humedad relativa) y por la química atmosférica.

En esta tesis se caracterizaron bioaerosoles de ambientes extremos. Los resultados obtenidos ponen en evidencia, la presencia de bacterias de lagos Patagónicos y desde la zona de Huara en el norte de Chile. Observándose formas bacterianas bacilares y cocáceas. Estos resultados coinciden con lo señalado por diversos autores (Douwes J et al. 2003; Wittmaak K et al 2005; Fahlgren et al. 2010). Quienes observaron la presencia de microorganismos, incluyendo bacterias, en muestras de aire tomadas desde diferentes lugares.

En los bioaerosoles, tanto de agua de los lagos Patagónicos como del desierto, se encontraron un recuento total de células viables (cultivables) del orden de 5×10^3 a 7×10^3 UFC/ml.

Estos resultados coinciden con lo informado por trabajos anteriores donde se señala que el aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. La presencia de uno u otro tipo depende del origen, de la dirección e intensidad de las corrientes de aire y de la supervivencia del microorganismo (Dietrich 2009).

La presencia de bacterias en la atmósfera ha sido demostrada por su crecimiento en medios de cultivo denominándose cultivables. Sin embargo, se considera que esto representa sólo una pequeña fracción de la población que llega a la atmósfera (Rosas et al. 2004).

Al caracterizar las bacterias aisladas desde las muestras en estudio se observó que la mayoría de las bacterias de los bioaerosoles fueron Gram negativas. Este resultado no concuerda con lo informado por Sarica et al. (2002) y Augustowska y Dutkiewicz (2006) quienes señalan que es más frecuente aislar bacterias Gram positivas, ya que las Gram negativas se encuentran en menor proporción y disminuyen con la altura debido a que tienen una pared celular frágil que no tolera la deshidratación cuando se someten a la exposición al aire durante períodos prolongados o durante el muestreo. Estos autores utilizaron muestras de zonas con características diferentes a las zonas en estudio.

Las bacterias Gram positivas tienen una pared más resistente y algunas producen esporas que les dan una mayor resistencia a las variaciones en las condiciones ambientales. (Goyer et al. 2001). Sin embargo, las bacterias Gram negativas predominan en ambientes de aguas marinas y esa podría ser la explicación ya que las muestras de zonas desérticas se encuentran relativamente cerca del océano Pacífico, además las bacterias Gram negativas sobreviven mejor a baja humedad relativa, condiciones encontradas en algunas zonas de muestreo.

La presencia de bacterias ya sea Gram positivas o negativas lleva consigo la presencia de esfingolípidos bacterianos que se ha informado tienen diversas

actividades biológicas (Heung et al. 2006), tales como la inducción de citoquinas, inducción de la apoptosis celular (Minamino et al. 2003).

Las bacterias Gram positivas y negativas acarrearán también la presencia del peptidoglicano, componente de la pared celular de las bacterias. Son sospechosos de ser un agente causal potencial de la inflamación pulmonar asociada con la inhalación de las bacterias (Goyer et al. 2001).

La relevancia de encontrar un mayor porcentaje de bacterias Gram negativas, en los bioaerosoles estudiados, tiene relación con la presencia de endotoxinas. Las Endotoxinas, el lipopolisacárido (LPS) se encuentra a nivel de la membrana externa de bacterias Gram negativas y son pirógenos (que causan fiebre) y tienen propiedades tóxicas (Martínez et al. 2004). También poseen fuertes propiedades proinflamatorias y están presentes en muchos entornos así como en el medioambiente (Eduard et al. 2008).

La exposición por vía aérea de la endotoxina, activa a los macrófagos a nivel pulmonar secretando $TNF\alpha$, el mediador de los síntomas agudos causado por endotoxina: fiebre, malestar general, aumento de la reactividad de las vías respiratorias y obstrucción del flujo aéreo (Rylander y Jacobs 1994; Macher 1999).

Dentro de las bacterias Gram negativas presentes en los bioaerosoles de Lagos Patagónicos, se identificó una bacteria inusual cuyas propiedades bioquímicas correspondieron a la bacteria CDC NO-1. Esta bacteria está asociada a la mordedura de perros y gatos (Kaiser et al. 2002; Winn et al. 2008), además se ha aislado desde la boca y secreción nasal de dichos animales (Kaiser et al. 2002).

Cabe destacar que existen solamente 2 publicaciones anteriores de Hollis D.G. et al (1993) y Kaiser R. et al (2002). En este trabajo se aisló desde muestra de bioaerosoles del lago Alto y lago Verde y es la primera vez que se reporta en el ambiente.

Las bacterias identificadas de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y análisis moleculares correspondieron a los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Moraxella*, *Sphingomonas*, *Bacillus* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Estos géneros coinciden con algunos de los reportados por otros autores (Jones y Harrison 2004; Lighthart y Shaffer 1994; Sarica et al. 2002; Beggs et al. 2008).

El género *Acinetobacter*, ha sido aislado frecuentemente en las muestras estudiadas en este trabajo y esto coincide con estudios similares donde señalan la presencia de esta bacteria en lagos oligotróficos y se ha reportado frecuentemente en muestras de bioaerosoles (Harper et al. 2013; Beggs et al. 2008; Sarica et al. 2002; Hameed and Khodr 2001).

Acinetobacter es una bacteria ubicua en el ambiente y está asociada con un amplio rango de infecciones particularmente en personas inmunosuprimidas. Se ha ido incrementando, con los años, que esta bacteria se transmitiría por vía aérea de acuerdo a lo señalado por Beggs et al. 2002.

Al estudiar la susceptibilidad de bacterias, aisladas desde la zona desértica de Huara, frente a diferentes antibióticos, se encontró una resistencia a antibióticos comúnmente usados en el ámbito hospitalario. En literatura no existe información de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de bioaerosoles de origen natural, pero si se han aislado bacterias resistentes a antibióticos desde bioaerosoles de criaderos de cerdos, sistemas de tratamiento de aguas servidas, en centros hospitalarios, etc. (Allen et al. 2010).

La aparición y persistencia de bacterias múltiples resistentes plantean crecientes desafíos a la salud pública mundial. El uso de antibióticos en medicina humana ha influenciado la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos (WHO 2012).

Investigaciones anteriores se han centrado principalmente en la detección de bacterias resistentes a los antibióticos en infecciones adquiridas en el medio hospitalario. Recientemente, con el descubrimiento de cepas multiresistentes en la comunidad en general, se ha comenzado a dar cuenta del peligro potencial de la propagación de estas bacterias resistentes a los antibióticos (Zhou y Wang 2013).

La transmisión de bacterias resistentes a los antimicrobianos puede ocurrir a través del contacto directo, el agua contaminada, el aire, el medio ambiente, y la comida (Akwar et al. 2007). De acuerdo con la Escuela Johns Hopkins Bloomberg de Salud Pública de equipo, la inhalación de bacterias desde el aire podría constituir una vía de exposición de cómo la resistencia puede ser transmitida al hombre.

Los microorganismos especialmente las bacterias patógenas pueden tener resistencia a los antibióticos de forma natural y pasar este material genético a la descendencia a través de la replicación. Las bacterias también pueden adquirir resistencia genética a través del intercambio de material genético entre célula y célula a través de la transferencia horizontal de genes , por transformación, transducción o conjugación (Perron et al 2012).

Los plásmidos desempeñan un papel importante en la propagación de genes de resistencia a antibióticos entre las bacterias y en la aparición de la multiresistencia. Al pesquisar la presencia de plásmidos en las cepas multiresistentes se obtuvo la primera evidencia de la presencia de plásmidos en bacterias de bioaerosoles de ambientes extremos y más aún la primera evidencia de la presencia de genes relacionados con plásmidos de amplio rango de hospedador.

Los plásmidos desempeñan un papel importante en la adaptación de las bacterias al medio ambiente o al stress causado por el hombre. La rápida difusión de genes de resistencia a antibióticos en poblaciones bacterianas como consecuencia del uso intensivo de antibióticos puede atribuirse en parte a la

transferencia horizontal mediada por plásmidos (conjugación). Los plásmidos capaces de ser transferidos y mantenidos de forma estable en una amplia gama de bacterias, también llamados plásmidos de amplio rango de hospedador, son de especial interés en relación con el intercambio de genes entre diferentes especies. (Yano et al 2011)

En cuanto a los estudios de viabilidad de bacterias de bioaerosoles en zonas remotas, los resultados obtenidos en el presente trabajo son los primeros resultados preliminares. La viabilidad queda en evidencia al observar un aumento constante del número de células/ ml en el tiempo. Las bacterias identificadas en muestras de arena y bioaerosoles del desierto fueron similares destacándose nuevamente la presencia, en la mayoría de los microcosmos, de la bacteria *Acinetobacter sp.* esta es una bacteria viable transportada por el aire y con el potencial de desarrollarse en aguas de lagos y además agrupa especies oportunistas altamente patógenas y resistentes para el hombre (Bergogne-Berezin y Towner 1996).

La actividad metabólica observada es similar entre ambos microcosmos en estudio (con arena y con bioaerosoles) y se debe a la presencia de bacterias similares en ellas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede señalar que los bioaerosoles son viables en agua de lagos Patagónicos y en la eventualidad de que logren trasladarse a través de grandes distancias podrían depositarse en lagos de zonas remotas causando alteraciones a dicho ecosistema. Estos ecosistemas lacustres responden rápidamente a las perturbaciones ambientales y pueden considerarse como indicadores sensibles del cambio global (Catalan et al. 2006) emergiendo como un sistema conveniente para monitorear la dispersión bacteriana, debido a que en estos lagos se dan condiciones ambientales extremas y particulares por su localización geográfica. Una perturbación causada por microorganismos aloctonos puede producir la desintegración de los microhabitats presentes (Torsvik et al. 2002).

Ahora bien en cuanto al diseño experimental llevado a cabo en los microcosmos estudiados ha facilitado la activación celular y el crecimiento en condiciones más cercanas a la oligotrofia, condición característica de los lagos en estudio. No obstante, las implicancias ecológicas deben ser cuidadosamente extrapoladas a partir de estos experimentos porque los posibles competidores locales y depredadores fueron excluidos de los microcosmos, y las condiciones de incubación no son exactamente las mismas que las condiciones locales (UV y regímenes de luz, cambios diarios marcados en la temperatura, entre otros). Sería necesario realizar ensayos a escala temporal más real y combinarlo con el uso de otras herramientas moleculares.

En los estudios realizados con microcosmos en agua de los lagos Alto, Verde y Esponja y con muestras de arena y bioaerosoles no se han encontrado diferencias significativa,. Estudios similares como el de Hervàs et al. (2009) señalan en sus resultados que no se produjo diferencias significativas en el número final de células bacterianas producidas entre las diferentes aguas de lagos utilizados, los cuales tienen características similares a los usados en este estudio. Incluso en sus estudios con microcosmos al igual que en los resultados obtenidos en este trabajo no se observaron diferencia significativa entre los dos microcosmos (arena y bioaerosoles) en estudio para cada uno de los lagos. Las bacterias asociadas al polvo, probablemente se derivan directamente de los suelos cuando el primero se moviliza por los vientos. Esto se demuestra con los resultados obtenidos en los experimentos con microcosmos, donde la mayoría de las bacterias aisladas desde el microcosmos que contenía las muestras de bioaerosoles, también se aislaron en el que tenía arena. Pero también algunas bacterias pueden ser inyectadas en las masas de aire con polvo a partir de fuentes locales por la advección y mezcla vertical de las nubes convectivas detectadas en lo suelos (Hervàs et al. 2009).

Los lagos Patagónicos así como los de montaña, mencionados en diferentes investigaciones, son ecosistemas a menudo considerados prístinos y remotos

en gran parte no afectados por factores antropogénicos locales debido a su inaccesibilidad. Por esta razón, se ha propuesto que este tipo de lagos pueden servir como centinelas de algún tipo de cambio global (Catalán et al. 2006).

La dispersión atmosférica de bacterias a través de grandes distancias es una faceta importante de la ecología microbiana. Ciertas especies bacterianas dispersadas se adaptan a su nueva ubicación al llegar a entornos favorables pudiendo afectar los ecosistemas ya establecidos, por otro lado las condiciones ambientales extremas inhiben ampliamente la distribución geográfica de las bacteria dispersadas(Finlay et al. 2002; Fenchel et al. 2004)

La migración de las bacterias es un fenómeno natural promovido por las corrientes oceánicas y fenómenos atmosféricos. El polvo eólico, que consiste en partículas de suelo procedentes de los desiertos o regiones áridas, se genera a partir de la erosión eólica. El polvo del desierto se transporta, a veces a grandes distancias, por las corrientes de aire. Los microorganismos presentes en las partículas de polvo pueden tener repercusiones en los ecosistemas de acuerdo a la dirección del viento y a menudo se piensa que es perjudicial para la salud humana (Yamaguchi et al. 2012)

La dispersión de aerosoles abióticos y biológicos (bioaerosoles), tiene un creciente interés en la investigación interdisciplinaria que comprende la epidemiología, la salud pública y la física atmosférica. Esto se debe a la gran capacidad de las masas de aire para transportar organismos viables y polvo inorgánico hacia zonas remotas, donde transforman las condiciones locales y puede afectar la salud humana (Main 2003). El transporte de polvo involucra el transporte de hasta 10.000 células bacterianas por gramo de suelo de algunas áreas del desierto (Kuhlman et al. 2005)

Los microorganismos aislados, caracterizados e identificados en las muestras de la zona desértica del presente estudio, usando al viento como medio de transporte, serían posibles colonizadores de algún lugar a grandes kilómetros de distancia desde su origen, donde puedan ser capaces de depositarse, entre

ellos podrían ser los lagos Patagónicos. De acuerdo a esto se puede señalar que dichos microorganismo transportados como parte de los bioaerosoles podrían alterar el ecosistema del lugar donde se depositen e incluso causar efectos adversos sobre la salud humana.



CAPITULO VIII



Conclusiones

1. En las muestras de bioaerosoles de zonas remotas, tanto de Lagos Patagónicos como de la zona de Huara, se detectó la presencia de bacterias, predominando las bacterias gram negativas.
2. De acuerdo a las propiedades bioquímicas y análisis moleculares los géneros identificados en las muestras de bioaerosoles de Lagos Patagónicos fueron *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Edwarsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Moraxella* y *Sphingomonas*.
3. Los géneros identificados en las muestras de bioaerosoles y de arena de la zona de Huara fueron *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Edwarsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Moraxella*, *Sphingomonas*, *Bacillus* y *Stenotrophomonas maltophilia*.
4. En muestras de bioaerosoles de Lago Alto y Verde se detectó una bacteria inusual, la CDC NO-1, asociada a las mordeduras de perros y gatos y corresponde al primer aislamiento en muestras de origen ambiental.
5. Las bacterias aisladas, desde bioaerosoles del desierto, presentaron multiresistencia a antibióticos, comúnmente usados en el ambiente hospitalario. En estas bacterias se detectó la presencia de un plásmido de peso molecular de 9,4 kb que contiene los genes *trfA1* y *OriT* que caracteriza a un plásmido de amplio rango de hospedador.

6. Los ensayos de microcosmos demostraron, que tanto los bioaerosoles como las bacterias presentes en la arena de Huara aumentaron en número en el tiempo. Este resultado indica que los bioaerosoles son viables en lagos patagónicos.
7. Los bioaerosoles del desierto llevan bacterias que provienen de la arena y al producirse torbellinos alcanzan la atmosfera y por acción de los vientos se desplazarían a grandes distancias y depositarían en ecosistemas de zonas remotas manteniendo su viabilidad.



CAPITULO X



Referencias

Akwar TH, Poppe C, Wilson J, Reid-Smith, R.J., Dyck, M, Waddington, J., Shang, D., Dassie, N., McEwen, S.A. (2007). Risk factors for antimicrobial resistance among fecal *Escherichia coli* from residents on forty-three swine farms. Microbial Drug Resistance. Spring;13(1):69-76.

Albrecht, A., Witzemberger, R., Bernzen, U., Jäckel, U. (2007). Detection of airborne microbes in a composting facility by cultivation based and cultivation-independent methods. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 14: 81-85.

Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., Delort, A (2007a). Microorganism isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. FEMS Microbiology Ecology 59: 242-254.

Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., Delort, A (2007b). An important oceanic source of microorganisms for cloud water at Puy de Dôme (France). Atmospheric Environment 41: 8253 - 8263.

Arbelli, Z. (2009) Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): I. El caso de los bifenilos policlorados (PCB). Acta biológica Colombiana, 14, 1, 57 – 88.

Ariya, PA., Sun, J., Eltouny, NA., Hudson, ED., Hayes, CT., Kos G. (2009). Physical and chemical characterization of bioaerosols-Implications for nucleation processes. *International Reviews in Physical Chemistry*, 28: 1, 1-32.

Atlas, R. , Bartha R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Ed. Pearson Educación, Madrid.

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.

Baron, JS., Caine, N. (2000). Temporal coherence of two alpine lake basins of the Colorado Front Range, USA. *Freshwater Biology*, 43: 463–476.

Bär, M.; von Hardenberg, J., Meron, E., Provenzale, A. (2002). Modelling the survival of bacteria in drylands: the advantage of being dormant. *Proceedings of the Royal Society* 269: 937-942.

Barrie, LA., Gregor, D., Hargrave, B., Lake, R., Muir, D., Shearer, R., Tracey, B. Bidleman, T. (1992). Arctic contaminants: sources, occurrence and pathways. *Science of the Total Environment*, 122:1-74.

Beggs, C.B., Kerr, K.G., Noakes, C.J., Hathway, E.A, Sleight, P.A. (2008) The ventilation of multiple-bed hospital wards: review and analysis. *American Journal of Infection Control*, 36, 250-259.

Bowers, R.M., McCubbin, I.B., Hallar, A.G., Fierer, N. (2012). Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site. *Atmospheric Environment*, 50: 41-49.

Bowers, R.M., Sullivan, A.P., Costello, E.K., Collet, J.L., Knight, R., Fierer, N. (2011b). Sources of bacteria in outdoor air across cities in the Midwestern United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 6350-6356.

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.

Burkow, IC., Kallenborn R. (2000). Sources and transport of persistent pollutants to the Arctic. *Toxicology Letters*, 112-113:87-92.

Burrows, S.M., Butler, T., Jöckel, P., Tost, H., Kerckweg, A., Pöschl, U., Lawrence, M.G. (2009b). Bacteria in the global atmosphere – part 2: modeling of emissions and transport between different ecosystems. *Atmospheric Chemistry and Physics* 9: 9281-9297.

Carreras, C., Torres, M., Riveros, J. (2004). Análisis de aerosoles atmosféricos de la ciudad de San Luis mediante XRD; XRF y SEM. *Anales del IX Seminario Latinoamericano de Análisis por Técnicas de Rayos X (SARX). Avances en Análisis por Técnicas de Rayos X, Volumen XIII.*

Catalan, J., Camarero, L., Felip, M., Pla, S., Ventura, M., Buchaca, T., Bartumeus, F., De Mendoza, G., Miró, A., Casamayor, E.O., Medina-Sánchez,

J.M., Bacardit, M., Altuna, M., Bartrons, M., Díaz de Quijano, D. (2006) High mountain lakes: extreme habitats and witnesses of environmental changes. *Limnetica*, 25, 551-584.

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

Dewi Puspita, I., Kamagata, Y., Tanaka, M., Asano, K., Nakatsu, C.H. (2012) Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbes and Environments*, 27: 356-366.

Dietrich, D. (2009). Una Introducción al Muestreo de Bioaerosoles. USA: SKC Inc.

Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003) Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. *Annals of Occupational Hygiene*, 47, 187–200.

Easterling, DR., Gerald, Al., Parmesan, C., Changnon, S., Karl, T., Mearns L. (2000). Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. *Science*, 289, 2068.

Eduard, W., Douwes, J., Thorne, P. S. (2008). Bioaerosols. *Bioaerosols Elsevier*, 287-297.

Elbert, W., Taylor, P.E., Andreae, M.O., Pöschl, U. (2007) Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharge spores, carbohydrates, and inorganic ions. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7:4569–4588.

Estellano, V.H., Harner, T., Pozo, K., Zaballa, M., Romero M. (2006). Concentración de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) en un gradiente altitudinal durante las estaciones de verano y otoño en la cara oriental de la cordillera Real de los Andes, Bolivia *Acta Nova*; Vol. 3, Nº 2.

Fahlgren, C., Hagstrom, A., Nilsson, D., Li, U. (2010) Annual Variations in the Diversity, Viability, and Origin of Airborne Bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 76, 3015–3025.

Favet, J., Lapanje, A., Giongo, A., Kennedy, S., Aung, Y., Cattaneo, A., Davis-Richardson, A.G., Brown, C.T., Kort, R., Brumsack, H., Schnetger, B., Chappell, A., Kroijenga, J., Beck, A., Schibbert, K., Mohamed, A.H., Kirchner, T., Dorr de Quadros, P., Triplett, E.W., Broutghton, W.J., Gorbushina, A.A. (2013). Microbial hitchhikers on intercontinental dust: catching a lift in Chad. *The ISME Journal* 7: 850-867.

Fernández, P., Grimalt J.O. (2003). Biodegradation Of Persistent Organic Pollutants (POPs):I The Case Of Polychlorinated Biphenyls (PCB). *Chimia* 57, 514–521.

Fierer, N., Liu, Z., Rodríguez-Hernandez, M., Knight, R., Henn, M., Hernandez, M. (2008). Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 74,1, 200–207.

Finlay, B. J. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, 296, 1061–1063.

Fenchel, T. & Finlay, B. J. (2004). The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Bioscience*, 54, 777–784.

Franzetti, A., Gandolfi, I., Gaspari, E., Ambrosini, R., Bestetti, G. (2011) Seasonal variability of bacteria in fine and coarse urban air particulate matter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 745-753.

Fuzzi, S., Andreae, MO., Huebert, BJ., Kulmala, M, Bond, TC., Boy, M., Doherty, S.J., Guenther, A., Kanakidou, M., Kawamura, K., Kerminen, V.M., Lohmann, U., Russell, LM., Pöschl, U. (2006). Critical assessment of the current state of scientific knowledge, terminology, and research needs concerning the role of organic aerosols in the atmosphere, climate, and global change. *Atmospheric Chemistry and Physics* 6, 2017-2038. *Atmosphere, Chemical, and Physics*, 6, 2017-2038.

Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309:1387–1390.

Garrison, V., Shinn, E., Foreman, W., Griffin, Ch., Kellog, C., Majewski ,M., Richardson, L., Ritchie, K., Smith, G. (2003). African and Asian Dust: From Desert Soils to Coral Reefs. *BioScience*, 53, 469–480.

Georgakopoulos, D., Després, V., Fröhlich-Nowoisky, R., Psenner, R., Ariya, PA., Pósfai, MP., Ahern, HE., Moffett, BF., Hill, TCJ. (2009). Microbiology and atmospheric processes: biological, physical and chemical characterization of aerosol particles *Biogeosciences*, 6, 721–737.

Grammatika, M., Zimmerman, W.B. (2001). Microhydrodynamics of flotation processes in the sea surface layer. *Dynamics of Atmosphere and Oceans*, 34: 327-348.

Goiun, T., Mackay, D., Jones, K., Harner, T., Meijer, S. (2004). Evidence for the “grasshopper” effect and fractionation during long-range atmospheric transport of organic contaminants. *Environmental pollution*. 128: 139-148.

Goyer, N., Levoie, J., Lazure, L., Marchand, G. (2001). *Bioaerosols in the Workplace: Evaluation, Control and Prevention Guide*. Études et Reserches.

Griffin, D., Garrison V., Herman J., Shinn E. (2001). African desert dust in the Caribbean atmosphere: Microbiology and public health. *Aerobiologia*, 17: 203–213.

Griffin, DW. (2005). *Clouds of Desert Dust and Microbiology: A Mechanism of Global Dispersion*. *Microbiol. Today*, November.

Griffin, DW. (2007). Atmospheric Movement of Microorganisms in Clouds of Desert Dust and Implications for Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 3, 459–477.

Hameed, A., Khodr, M.I. (2001) Suspended particulates and bioaerosols emitted from an agricultural non-point source. *Journal Environmental Monitoring*, 3, 206-209.

Harper, T., Bridgewater, S., Brown, L., Pow-Brown, P., Stewart-Johnson, A., Adesiyun, A. (2013) Bioaerosol sampling for airborne bacteria in a small animal veterinary teaching hospital. *Infection Ecology and Epidemiology*, 3, 20376

Han, Y., Li, L., Liu, J., Zhang, M. (2012). Microbial structure and chemical components of aerosols caused by rotating brushes in a wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 4097-4108.

Hans, W., Paerl, A., Julianne, D., Moisander, PH., Noble, RT., Piehler, MF., Pinckney, JL., Steppe, TF., Twomey, L., Valdes LM. (2003). Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiology Ecology*. 46 233-246.

Hervás, A., Camarero, L., Reche, I., Casamayor EO. (2009). Environmental Microbiology. Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe, 11(6), 1612–1623

Hervás, A., Casamayor, EO. (2009). High similarity between bacterioneuston and airborne bacterial community compositions in a high mountain lake area FEMS Microbiology Ecology, 67 219–228.

Heung LJ, Luberto C, Del Poeta M. (2006). Role of sphingolipids in microbial pathogenesis. Infect Immun 74, 2839.

Hollis, D., Moss, C., Daneshvar, M., Meadows, L., Jordan, J., Hill, B. (1993) Characterization of Centers for Disease Control group NO-1, a fastidious, nonoxidative, gram-negative organism associated with dog and cat bites. Journal of Clinical Microbiology, 31, 746–748.

Iwasaka, Y., Shi, GY., Yamada, M., Kobayashi, F., Kakikawa, M., Maki, T., Naganuma, T., Chen, B., Tobo, Y., Hong CS. (2009). Mixture of Kosa (Asian dust) and bioaerosols detected in the atmosphere over the Kosa particles source regions with balloon-borne measurements: possibility of long-range transport Air Quality, Atmosphere and Health. 2:29–38.

Jaenicke, R. (2005). Abundance of cellular material and proteins in the atmosphere, Science, 308, 73.

Jaward, F., Farrar, N., Harner, T., Sweetman, A., Jones K. (2004). Passive air sampling of PCBs, PBDEs, and organochlorine pesticides across Europe. Environmental Science & Technology. 38, 34-41.

Jones, A.M., Harrison, R.M. (2004) The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations a review. *Science Total Environmental*, 326, 151–180.

Kanakidou, M., Seinfeld, JH., Pandis, SN., Barnes, I., Dentener, FJ., Nielsen, CJ., Swietlicki, E., Putaud, JP., Balkanski, Y., Fuzzi, S., Horth, J., Mootgat, GK., Winterhalter, R., Myhre, CEL., Tsigaridis, K., Viganti, E., Stephanou, EG., Wilson J. (2005). Organic aerosol and global climate modeling: a review. *Atmospheric Chemistry and Physics* 5:1053–1123.

Kaiser, R.M., Garman, R.L., Bruce, M.G., Weyant, R.S., Ashford, D.A. (2002) Clinical significance and epidemiology of NO-1, an unusual bacterium associated with dog and cat bites. *Emerging Infectious Diseases*, 8,171-4.

Keene, WC., Galloway JN. (1988) The biogeochemical cycling of formic and acetic acids through the troposphere: an overview of current understanding. *Tellus* 40B: 322–334.

Kellogg, C A., Griffin D W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 638.

Kuhlman, K.R., Allenbach, L.B., Ball, C.L., Fusco, W.G., La Duc, M.T., Kuhlman, G.M., Anderson, R.C., Erickson, I.K., Stuecker, T., Benardini, J. and Crawford, R.L. (2005) Enumeration, isolation, and characterization of ultraviolet(UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains, California. *Icarus*, 174, 585-595.

Kuske, CR., Barns, SM., Busch JD. (1997). Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Applied Environmental Microbiology*, 63:3614–3621.

Lekunberri, I., Lefort, T., Romero, E., Vasquez-Dominguez, E., Romero-Castillo, C., Marrase, C., Peters, F., Weinbauer, M., Gasol, JM. (2010). Effects of a dust deposition event on coastal marine microbial abundance and activity, bacterial community Estructure and ecosystem function. *Journal of Plankton Research* vol 32, 4,381–396.

Lighthart, B., Shaffer, B.T. (1994) Bacterial flux from chaparral into the atmosphere in mid-summer at a high desert location. *Atmospheric Environmental*, 28, 1267–1274.

Lohmann, U., Feicher J. (2005) Global indirect aerosol effects: a review. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 5, 715–735.

Main, C.E. (2003) Aerobiological, ecological, and health linkages. *Environment International*, 29, 347-349.

Maier, RM., Drees, K P., Neilson, JW., Henderson, DA., Quade, J., Betancourt JL. (2004). Microbial life in the Atacama Desert. *Science*, 306:1289–1290.

Macher J. (editor), (1999). Endotoxin and other bacterial cellwall components, in *Bioaerosols. assessment and control*, American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, Ohio, USA. chapter 23.2.

Martinez, K., Rao, C., Burton, N. (2004). Exposure assessment and analysis for biological agents. Grana - Taylor & Francis, 193-208.

McClure, NC., Fry, JC., Weightman, AJ. (1991). Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory-scale activated-sludge unit. *Applied Environmental Microbiology*, 57:366-373.

Meakin, S. (2000.) COPs: What's new with COPs research in the Artic. Canadian Artic Resources Committee. *Northern Perspectives* 26.1 ,6-7.

Mendoza, G., Gutiérrez, L., Pozo-Gallardo, K., Fuentes-Ríos, D., Montory, M., Urrutia, R., Barra R. (2006). Polychlorinated biphenyls (PCBs) in mussels along the chilean coast. *Environmental Science & Pollutants Research*, 13,1, 67-74 pp.

Minamino, M., Sakaguchi, I., Naka, T., Ikeda, N., Kato, Y., Tomiyasu, I., Yano, I., Kobayashi ,K. (2003) Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells. *Microbiology*, 149, 207181.

Miskin, I., Rhodes, G., Lawlor, K., Saunders, JR., Pickup RW. (1998). Bacteria in post-glacial freshwater sediments. *Microbiology* 144, 2427–2439.

Mladenov, N., López-Ramos, J., McKnight, DM., Rechea I. (2009). Alpine lake optical properties as sentinels of dust deposition and global change. *Limnology and Oceanography*. 54, 3, 869–879.

Möhler, O., Demott, P.J., Vali, G., Levin, Z. (2007). Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences*, 4,1059–1071.

Morales-Baquero, R., Pulido-Villena, E., Romera, O., Ortega-Retuerta, E., Conde-Porcuna, JM., Pérez-Martínez, C., Reche I. (2006). Significance of atmospheric deposition to freshwater ecosystems in the southern Iberian Peninsula *Limnetica*, 25,1-2, 171-180.

Morris, CE., Sands, DC., Bardin, M., Jaenicke, R., Vogel, B., Leyronas, C., Ariya, P. A., Psenner R.(2008). *Biogeosciences Discuss*, 5, 191.

Moulin, C., Chiapello I. (2006). Impact of human-induced desertification on the intensification of Sahel dust emission and export over the last decades. *Geophysical Research letters*, vol. 33.

Navarro-Gonzalez, R., Rainey, FA., Molina, P., Bagaley, DR., Hollen, BJ., De la Rosa, J., Small, AM., Quinn, RC., Grunthaner, FJ., Caceres, L., Gomez-Silva ,B., McKay CP. (2003). Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. *Science*, 302:1018–1021.

Neff, JC., Ballantyne, AP., Farmer, GL., Mahowalda, NM., Conroy, JL., Landry, CC., Verpeck, JT., Painterio, T H., Lawrence, CR., Reynolds RL.(2008). Increasing eolian dust deposition in the Western United States linked to human activity. *Nature Geoscience*, 1, 3, 189-195.

Nguyen, T.M.N., Illef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J., Desenclos, J. (2006) A community-wide outbreak of Legionnaires Disease linked to industrial cooling towers – How far can contaminated aerosols spread? The Journal of Infectious Diseases 193: 102-111.

Oehme, M. (1991). Dispersion and transport paths of toxic persistent organochlorines to the article levels and consequences. Science of the Total Environment, 106, 43-53.

Papova, NA., Nikolaev, IA., Turova, TP., Lysenko, AM., Osipov, G A., Verkhovtseva, NV., Panikov N S. (2002). *Geobacillus uralicus*, a new species of thermophilic bacteria. Microbiology, 71, 391–398.

Peccia, J & Hernandez, M (2006) Incorporating polymerase chain reaction based identification, population characterization, and quantification of microorganisms in aerosol science: A review" Atmospheric Environment, 40: 3941-3961.

Perkins, S. (2001). Dust, the thermostat. Science News, 160, 200–201.

Perron, G.G., Lee, A.E., Wang, Y., Huang, WE., Barraclough, T.G. (2012). Bacterial recombination promotes the evolution of multi-drug resistance in functionally diverse populations. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, pages: 1477-1484.

Polymenakou, P., Mandalakis, M., Stephanou, E., Tselepides A. (2008). Environmental Health Perspectives. Particle Size Distribution of Airborne Microorganisms and Pathogens during an Intense African Dust Event in the Eastern Mediterranean, 116, 3.

Préndez, M., Ortiz, J., Zolezzi, S., Campos, C., Apablaza N. (1991). Aerosoles atmosféricos de naturaleza inorgánica contaminación en Santiago de Chile. Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias, 7, 4, 224.

Prospero, J.M., Lamb, P. (2003). African Droughts and Dust Transport to the Caribbean: Climate Change Implications. Science 7, 302, 5647, 1024-1027.

Prospero, JM., Blades, E., Mathison, G., Naidu, R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust Increasing eolian dust deposition in the western United States linked to human activity. Aerobiologia, 11: 203–213.

Ranjard, L., Poly, F., Nazaret S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture- independent molecular techniques: application to soil environment. Research Microbiology, 151:167-177.

Reche, I., Ortega-Retuerta, E., Romera, O., Pulido-Villena, E., Morales-Baquero, R. Casamayor, EO. (2009). Effect of Saharan dust inputs on, bacterial activity and community composition in Mediterranean lakes and reservoirs Limnology and Oceanography, 54(3), 869–879.

Rylander R, Jacobs R (editors) (1994). Organic dusts exposure, effects, and prevention, CRC, Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 7375.

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.

Sarica, S., Asan, A., Otkun, M.T., Ture, M. (2002). Monitoring indoor airborne fungi and bacteria in the different areas of Trakya University Hospital, Edirne, Turkey. Indoor and built Environment, 11, 285–292.

Sattler, B., Puxbaum, H., Psenner, R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. Geophysical Research Letters, 28: 239-242.

Sayler, GS., Harris, C., Pettigrew, C., Pacia, D., Breen, A., Sirotkin KM. (1987). Evaluating the maintenance and effects of genetically engineered microorganisms. Develops in Industrial Microbiology, 27:135-149.

Smets, W. (2013). Bacterial analysis of polluted air in Antwerp and surroundings Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van Master in de Bio-Ingenieurswetenschappen: Cel- en genbiotechnologie, Universiteit Gent. Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, VIII, 75.

Sommaruga, R., Casamayor, E. (2009). Bacterial 'cosmopolitanism' and importance of local environmental factors for community composition in remote high-altitude lakes. Freshwater Biology. 54, 994–1005

Sun, J., Ariya, PA. (2006). Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review. *Atmospheric Environment*. 40, 795.

Tiedje, JM., Colwell, RK., Grossman, YL., Hodson, RE., Leunski, RE., Mack, RN. Regal, PJ. (1989). The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *SIM News* 39:149-166.

Tilley, RI. (1997) *Bioaerosols: A Survey*. DSTO. Aeronautical and Maritime research Laboratory. 20p.

Tolgyessy, J. (1993). *Chemistry and Biology of water, air and soil. Environmental Aspects*. Scientific editor. 831p.

Tong, Y. & Lighthart, B. (1997) The annual bacterial particle concentration and size distribution in the ambient atmosphere in a rural area of the Willamette Valley, Oregon, *Aerosol Scientific Technology*, 32.

Torsvik, V., Ovreås, L., Thingstad T. (2002). Prokaryotic Diversity Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. *Science* 296, 1064 – 1066.

Valo, R., Haggblom, H., Salkinoja-Salonen, M.. (1990). Biological removal of chlorophenols from groundwater, p. 298. Abstr. 90th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1990. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Wagner- Dobler, I., Pipke, R., Timmis, K., Dwyer DF. (1992). Evaluation of Aquatic Sediment Microcosms and Their Use in Assessing Possible Effects of Introduced Microorganisms on Ecosystem Parameters. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 4, 1249-1258.

Wainwright, M., Wickramasinghe, N.C., Narlikar, J.V., Rajaratnam P. (2003). Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km, *FEMS Microbiology Letters* 218, 1, 161-165.

Washington, R., Todd, M., Middleton, N. J., Goudie AS. (2003). Dust storm source areas determined by the total ozone monitoring spectrometer and surface observations. *Annals of the Association of American Geographers*, 93, 297–313.

WHO.(2012). Antibiotic Resistance Fact Sheet 2012.

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schrenckenberger, P., Woods, G. (2008) Koneman -Diagnóstico Microbiológico. Argentina, Editorial Médica Panamericana.

Wittmaack, K., Wehnes, U., Agerer, R.(2005) An overview on bioaerosols viewed by scanning electron microscopy. *Science of The Total Environment*, 346,1, 244-255.

Womack, AM., Bohannon, BJM., Green, JL.. Biodiversity and biogeography of the atmosphere. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365,1558,3645–53.

Yamaguchi N, Ichijo T, Sakotani A, Baba T, Nasu M. Global dispersion of bacterial cells on Asian dust. (2012). Scientific Reports, 2:525.

Yano, H., Deckert , G., Rogers, L.M., Top, E. (2011) Roles of Long and Short Replication Initiation Proteins in the Fate of IncP-1 Plasmids. Journal of Bacteriology, 1533–1543.

Zhang, XY., Gong, SL., Zhao, TL., Arimoto R., Wang Y. Q. y Zhou ZJ. (2003). Sources of Asian dust and role of climate change versus desertification in Asian dust emission. Journal of Geophysical Research. Letters, 30:2272.

Zhou, F.; Wang, Y. (2013). Characteristics of Antibiotic Resistance of Airborne *Staphylococcus* Isolated from Metro Stations. Int. J. Environ. Res. Public Health, 10, 2412-2426.

