

Nº 9 - Año 2020
ISSN 2525 - 1597



USP-T

UNIVERSIDAD DE SAN PABLO - TUCUMÁN

REVISTA

ACADÉMICA

IDIITEC

Instituto de
Desarrollo
e Innovación
Tecnológica
para la
Competitividad
Territorial



UNIVERSIDAD
DE SAN PABLO-T
Tucumán | Argentina

IDITEC

**Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica
para la Competitividad Territorial**

Revista Académica

Universidad de San Pablo-Tucumán

Tucumán, República Argentina

IDITEC. Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial. Revista Académica.

N°9 – Año 2020

Tucumán, República Argentina.

ISSN 2525-1597

Revista de Investigación Académica

Editorial:

EDUSPT. 24 de Septiembre 476.
4000. San Miguel de Tucumán. Tucumán, Argentina.
Contacto: Informes@uspt.edu.ar
www.uspt.edu.ar

Quedan expresamente prohibidas, sin la autorización correspondiente, la reproducción parcial o total de esta obra, por cualquier medio o procedimiento. El contenido de los trabajos, como así también los permisos para reproducción de figuras y tablas, es responsabilidad de los autores.

© Universidad de San Pablo-Tucumán

Queda hecho el depósito que previene la ley

Impreso en Argentina – Printed in Argentina

ISSN 2525-1597

Diciembre de 2020

Autoridades de la Universidad

Presidente de la Fundación para el Desarrollo

Dra. Catalina Lonac

Rector

Dr. Ramiro Albarracín

Vicerrector

Dr. Inés de los Ángeles Yamúss

Director del Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial

Dr. Federico Pérez Zamora

Director del Instituto de Estudios Sociales, Política y Cultura

Mg. Laura Giusti

Director del Instituto de Salud y Calidad de Vida

Dra. Marta Valverde

Director del Instituto de Diseño, Estrategia & Creatividad

Arq. Matías Rohmer-Litzmann

Secretaria de Posgrado

Mag. Silvia Martínez

Secretaria Administrativa y Financiera

CPN María Cristina Peralta

Secretaria de Extensión y Cultura

Abog. Carolina del Valle López Flores

Secretaria de Investigación, Desarrollo y Cultura

Mag. Carlos Jorge Budeguer

Director

Prof. Mg. Karina González (USPT)

Consejo Editorial Científico:

Prof. Dra. María José Catalán (UNT-USPT)

Prof. Mg. Margarita Jaramillo (USPT)

Prof. Dr. Alejandro Daniel Rios (UNT-USPT)

Prof. Mg. Adriana del Valle Pastoriza (UNT)

Prof. Dra. Gabriela Zárate (USPT-CONICET)

Prof. CPN Cecilia Fabiana Gagliardi (USPT)

Prof. Arq. Josefina María del Valle Ocampo (USPT)

Pares evaluadores:

Prof. Mg. Marcela Blanca Colombo (UNT - USPT)

Prof. Mg. Adriana del Valle Pastoriza (UNT)

Prof. Dra. Juana Albarracín (USPT)

Dra. Luz Lastres Flores (ADEQRA)

Dra. Eugenia Giamminola (IEAH-UNSA)

Dr. Dariel Cabrera Mederos (IPAV-INTA)

Prof. Héctor Ostengo (UNT)

Prof. Mg. Alicia Margarita Nasif (UNT)

Prof. Dra. Natalia Zavadivker (UNT)



UNIVERSIDAD
DE SAN PABLO-T
Tucumán | Argentina

PRESENTACIÓN

IDITEC es una publicación semestral que recoge los resultados de los trabajos de investigación de profesores e investigadores nacionales y extranjeros, que sean de interés para la comunidad en las áreas de la Ciencia de los Alimentos, Agroindustria, Ciencias Económicas, Arquitectura y Diseño. La misión de IDITEC es abordar temas multidisciplinarios de investigación y/o análisis que posean un interés regional, nacional e internacional. Las publicaciones pueden realizarse en español, inglés o portugués. La Revista, está puesta al servicio de la comunidad científica y académica en general (docentes, investigadores y estudiantes), dirigida tanto a la teoría como a la práctica.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO PARA EL ESTUDIO DE MICROBIOMAS EN SUPERFICIES DEL AMBITO MEDICO-ASISTENCIAL
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY FOR THE STUDY OF MICROBIOMES ON SURFACES OF THE MEDICAL-ASSISTANCE FIELD

D'ARPINO M.C.^{1,2}, GALVÁN, F.S.¹, ALVARADO N.N.¹, MARRANZINO G.^{2,3}, MARTINEZ L.¹,
ALBARRACÍN V.H.^{1,2*}

¹Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME-CONICET-UNT) E-mail: cime@tucuman-conicet.gov.ar

²Cátedra de Biología Molecular e Ingeniería Genética, Universidad de San Pablo-T

³Banco Central de Sangre "Dr. César Guerra", (PRIS-SI.PRO.SA)

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar ultra-estructuralmente las comunidades microbianas presentes en el ámbito médico-asistencial. Se tomaron muestras de las superficies en distintos puntos por duplicado mediante cinta de papel y también se realizó el muestreo por hisopado y siembra en placas con medio de cultivo LB pH7 adicionado con antibióticos cicloheximida (CH) y cicloheximida más ácido nalidixico (CH/NA). Los sitios de muestreo fueron: mesadas, aires acondicionados y equipamientos, de los Servicios de Biología Molecular, Producción y Distribución del Banco Central de Sangre "Dr. César Guerra", (PRIS-SI.PRO.SA). El análisis de las cintas aplicando Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) permitió detectar *biofilms* en los diferentes sitios de muestreo. Los mismos presentaron una arquitectura tridimensional compleja caracterizada por microorganismos dispuestos en capas inmersas en abundante material extracelular. Los cultivos permitieron aislar 45 colonias que exhibieron diversos morfotipos (cocos, bacilos y cocobacilos) de mesadas, aires acondicionados y equipos. Mediante MEB fue posible analizar en detalle la estructura topográfica, organización y morfología de las bacterias aisladas. Se observó además, que algunas colonias establecían contactos estrechos. La técnica de MEB reveló un amplio espectro de relaciones entre ellas. Fue posible poner en evidencia cambios morfológicos en las bacterias como también la presencia de gran cantidad de material extracelular en los sitios de interacción. También, se identificaron diferencias en la conformación estructural de distintos sectores de algunas colonias. Este trabajo propone a las técnicas de microscopía de alta resolución como herramientas claves para el estudio *in-situ* de *biofilms* en superficies del ámbito médico-asistencial, debido a la estrecha relación que presentan con las enfermedades humanas.

PALABRAS CLAVE: Microbioma; *biofilms*; cepas aisladas; interacciones bacterianas; microscopía electrónica de barrido.

ABSTRACT

This study aimed at ultra-structurally characterizing the microbial communities present in the medical-healthcare field. Samples were taken in duplicate by means of paper tape and swabbing and plating in plates with LB pH7 culture medium added to antibiotics Cycloheximide (CH) and Cycloheximide/Nalidixic Acid (CH/NA). The sampling sites were countertops, air conditioning and equipment from the Production, Distribution and Molecular Biology Services at the Central Blood Bank "Dr. César Guerra", (PRIS-SI.PRO.SA). The analysis of the tapes done by applying Scanning Electron Microscopy (SEM) allowed the detection of biofilms in the different sampling sites. They presented a complex three-dimensional architecture characterized by microorganisms arranged in layers immersed in abundant extracellular material. The cultures allowed the isolation of 45 colonies which exhibited various morphotypes (cocci, bacilli, and coccobacilli) from countertops, air conditioning and equipment. Using SEM, it was possible to analyse in detail the topographic structure, organization and morphology of the isolated bacteria. It was also observed that some colonies established close contacts. SEM revealed a wide spectrum of relationships between them. It was possible to show morphological changes in the bacteria as well as the presence of a large amount of extracellular material at the interaction sites. In addition, differences were identified in the structural conformation of different sectors in some colonies. This work proposes high-resolution microscopy techniques as key tools for the *in-situ* study of biofilms on surfaces in the medical-healthcare field, given the close relationship they have with human diseases.

KEYWORDS: Microbiome; biofilms; isolated strains, bacterial interactions; scanning electron microscopy

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos se encuentran presentes en el aire, agua, alimentos y superficies, donde mediante diversas interacciones modulan numerosos aspectos de la calidad de vida y salud humana. En los últimos años, los estudios genómicos y metagenómicos han proporcionado una gran cantidad de información sobre la fisiología e historia evolutiva de microorganismos existentes en una amplia gama de ambientes (Hugenholtz & Tyson, 2008; Kurth et al., 2015; Nesme et al., 2016; Toneatti et al., 2017, Zhang et al., 2019). Se ha demostrado además que las comunidades microbianas en la naturaleza son complejas y dinámicas, que están constituidas por una alta biodiversidad de microorganismos y que colonizan toda variedad de entornos (Vikram et al., 2016). De hecho, los microorganismos representan la mayor parte de la biodiversidad en los ecosistemas urbanos (King, 2014). Un grupo de microorganismos (bacterias, arqueas, virus y eucariotas basales), la colección de sus genomas y las condiciones ambientales del hábitat que los rodea constituye un microbioma (Marchesi & Ravel, 2015). Podemos encontrar una indefinida variedad de microbiomas acuáticos, de suelo, extremos, simbioses, de superficies en concordancia con la enorme amplitud de posibilidades ambientales que ofrece nuestro planeta. Existe un creciente interés en analizar la relación entre los microbiomas y áreas de investigación como medio ambiente, biotecnología, diversidad y salud humana (Handelsman et al., 1998; Hooper y Gordon, 2001; Comeau et al., 2012). El enfoque del microbioma desde aspectos inherentes a su composición, mediante el estudio de muestras de ADN (Metagenómica), ARN (Metatranscriptómica), proteínas (Metaproteómica) y sustancias metabólicas (Metabolómica) ha aportado gran cantidad de datos sobre la composición y el funcionamiento de estas comunidades microbianas y cómo las mismas responden a los factores y condiciones del medio adoptando diversas dinámicas espacio-temporales (Mardis, 2011; Comeau et al., 2012; Ottman et al., 2012). Por otro lado, los métodos imagenológicos (*Bio-imaging*) resultan de suma importancia para localizar espacialmente y caracterizar una comunidad microbiana variada; permiten dilucidar las interacciones y las relaciones de comunicación intercelular entre microorganismos filogenéticamente diversos en una comunidad microbiana compleja tanto entre ellos como con el ambiente en el que se desarrollan (Knierim, 2012; Zhang et al., 2019). La microscopía electrónica es una metodología en auge que permite establecer la disposición, estructura y distribución de la gran biodiversidad de taxones en los distintos estratos que forman los microbiomas lo cual permite detectar interacciones entre distintos componentes de la comunidad y la organización funcional de las distintas capas (Farias et al., 2013; Toneatti et al., 2017). Los *biofilms* (biopelículas) son un tipo especial de microbiomas organizados en capas que habitualmente se forman en una interfase húmeda, tanto sobre superficies bióticas como abióticas (Vinh et al., 2005; Wimpenny, 2009; Seth et al., 2012;). Pueden colonizar la superficie metálica de dispositivos médicos como las válvulas, los marcapasos y los catéteres afectando negativamente sus funciones y causando graves infecciones intrahospitalarias (Dijkshoorn et al., 2007; Van Kleef et al., 2013). Algunos ejemplos de afecciones médicas asociadas con *biofilms* son aquellas derivadas de dispositivos permanentes en vías, la placa dental, las infecciones del tracto respiratorio superior, peritonitis y las infecciones urogenitales a menudo asociadas con una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos (Bryers et al., 1999; Ferri et al., 2017., Zingg et al., 2019). La resistencia antimicrobiana tiene un gran impacto en el ámbito asistencial-sanitario ya que las personas infectadas requieren una hospitalización más prolongada, a menudo asociada a un mal pronóstico (Ferri et al., 2017). La resistencia microbiana a los medicamentos es un problema de salud mundial causado por el uso incontrolado de antibióticos en la medicina y en la agricultura. Se prevé que hacia 2050 alrededor de 10 millones de personas morirán anualmente por motivos relacionados con la resistencia a medicamentos (O'Neill, 2014). Si bien los patógenos resistentes son la principal preocupación, los canales microbianos globales de intercambio de genes existentes entre taxones microbianos no relacionados (e.g. pili) permiten que los microbios comensales compartan genes de resistencia con oportunistas (Cusumano y Hultgren, 2009; Dickey et al., 2017). Para evitar la colonización de superficies con *biofilms* microbianos, se pueden usar agentes químicos o biocidas y así esterilizar superficies metálicas. Sin embargo, estos tratamientos preventivos no son suficientes para controlar la formación de *biofilms* (Sultana et al., 2015). Más aún, las bacterias que crecen en las *biofilms* son difíciles de erradicar debido a una combinación del efecto mecánico de varias capas protectoras junto con la capacidad intrínseca de estas bacterias de resistencia a antibióticos (Percival et al., 2010). Se ha demostrado que muchos microorganismos pueden mantenerse viables en las superficies luego del tratamiento de las mismas con sustancias de limpieza antimicrobianas (Hu et al., 2019). Entonces, resulta fundamental el estudio de las fuentes microbianas y el entendimiento de cómo los humanos pueden interactuar (o adquirir) nuevas especies comensales o patógenos peligrosos (Gire et al., 2014). Por lo anteriormente expuesto, se hace necesario el desarrollo de métodos más precisos que permitan estudiar con mayor eficacia y de forma sistematizada la formación de *biofilms*.

Además, los seres humanos pueden influir en las especies microbianas que se encuentran en las superficies a través del uso de ciertos antimicrobianos en particular sobre la resistencia de los mismos (Fahimipour et al., 2018). Estudios recientes se han abocado a dilucidar la composición de los microbiomas a fin de entender la relación entre ellos y la salud humana. Estos se centran en estudiar la metagenómica especialmente con técnicas de secuenciación avanzadas como NGS, (*Next Generation Sequencing*) (Zingg et al., 2019). Al presente, son pocos los estudios tendientes a analizar las comunidades microbiológicas desarrolladas *in-situ* en los ámbitos asistenciales y no hay estudios referidos a nuestro país. Es de destacar los análisis metagenómicos llevados a cabo en hospitales (Smith et al., 2013; Willmann et al., 2015; Lax et al., 2017) y ambulancias (O'Hara et al., 2017) en otros países, los cuales han permitido obtener datos sobre el perfil de la diversidad de microorganismos. Sin embargo, para poder contextualizar los datos metagenómicos en una estructura de comunidad tridimensional y dinámica como la que se encuentra en el ambiente original de estas comunidades, resulta de gran utilidad el uso y desarrollo de métodos imagenológicos de microscopía de alta resolución que aún se encuentra poco explorado para el estudio *in-situ* de *biofilms* de superficies (Knierim et al., 2012).

El objetivo de este trabajo fue explorar el potencial de los métodos de microscopía de alta resolución, especialmente de microscopía electrónica de barrido, para estudiar los *biofilms* desarrollados *in situ* en superficies de ambientes médicos asistenciales. Particularmente, se estudiaron los *biofilms in situ* y microorganismos predominantes en superficies de distintos laboratorios del Banco Central de Sangre “Dr. César Guerra”, en Tucumán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Banco de Sangre

En este trabajo se estudiaron muestras obtenidas del Banco Central de Sangre “Dr. César Guerra”, dependiente del Programa Integrado de Salud (PRIS-SI.PRO.SA) de la provincia de Tucumán-Argentina. Constituye el único servicio de salud pública destinado a los procesos de donación, preparación, almacenamiento y distribución de productos sanguíneos. La sangre entera obtenida de los donantes es ingresada al servicio de Producción y Fraccionamiento encargado de la elaboración y distribución de los hemocomponentes (glóbulos rojos, plaquetas, plasma fresco congelado, crioprecipitado y otros). Para realizar su obtención, el laboratorio consta de centrifugas refrigeradas a 19 °C (Presvac DP-2065 R Plus). Las unidades procesadas y estudiadas bajo calificación y control, son enviadas al área de Distribución, donde se consignará cada componente a ser distribuido a cada servicio de hemoterapia correspondientes a los hospitales públicos y privados de la provincia, que reciben regularmente componentes de este Banco de Sangre. Las plaquetas deben conservarse entre 18 °C y 22 °C en agitación constante para no perder propiedades. Para ello la sala cuenta con agitadores de plaquetas termostatzados a 22 °C (Presvac AP-48 L). El servicio de Biología Molecular es el encargado de realizar el *Screening* de ácidos nucleicos de: Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de Hepatitis C (VHC) y Virus de Hepatitis B (VHB). Para ello cuenta con una plataforma automatizada, guiada por *softwares* constituida por los siguientes equipos: Pipeteador Hamilton MICROLAB STAR IVD/STARlet IVD, allí ingresan los tubos con sangre centrifugada, de los cuales se utiliza el plasma (donde se resuspenden los ácidos nucleicos) para formar los *pooles* de muestras (*pooles* de 6 o de 1, según corresponda la corrida diaria). Equipo COBAS® AmpliPrep, que es en donde se realiza la mix de PCR *real time* para cada uno de los *pooles* y finalmente un Analizador COBAS® TaqMan®, con 4 termocicladores *seteados* que lleva na cabo la PCR *real time* que permite detectar la presencia o no de ácidos nucleicos virales en función a los controles internos y externos.

Muestreo

Se seleccionaron tres áreas en particular a partir de las cuales se definieron los sitios de muestreo: el servicio de Producción, el servicio de Distribución de hemocomponentes y el servicio de Biología Molecular. Se tomaron muestras por duplicado del aire acondicionado (AAC-PRO), de la mesada de trabajo (M-PRO) y de la centrifuga (E-PRO) del laboratorio de Producción. Del agitador de plaquetas que se encuentra en el área de distribución (A-Plaq-PRO). Del equipo de aire acondicionado (AA-BM), mesada de reactivos (MR-BM), mesadas de trabajo (ME-BM) y equipos Cobas 201s Roche (E-BM) del laboratorio de Biología Molecular. Todas las muestras fueron obtenidas y procesadas de acuerdo a los estándares de bioseguridad correspondientes. Para el muestreo se utilizó cinta de papel e hisopos estériles. Se empleó el lado que contiene pegamento de las cintas para colectar los posibles microorganismos de las superficies de los sectores definidos y luego fueron colocadas en tubos *ependorf* conteniendo fijador Karnovsky (Glutaraldehído 1,7 % y Paraformaldehído 2,7 % en Buffer fosfato) a pH 7,2 durante 24 h. De los mismos sitios en estudio se colectaron muestras empleando un hisopo estéril y a continuación se realizó la siembra en cajas de Petri estériles conteniendo medio rico Luria-Bertani (LB) sólido, (Tryptona 1%, NaCL 1 %, Extracto de levadura 0,5 % y agar 1,5 %) a pH 7. Cada muestra fue sembrada en dos

placas, una de las cuales contenía cicloheximida (CH), que evita el crecimiento de hongos y la otra cicloheximida más ácido nalidixico (CH/NA) que inhibe el crecimiento tanto de hongos como de bacterias Gram negativas.

Estas muestras fueron procesadas de manera que permitan aislar microorganismos predominantes en cada uno de los sitios de muestreo como también para el estudio de las comunidades microbianas *in situ* mediante microscopía de alta resolución.

Cultivos bacterianos

Las muestras fueron colectadas desde las superficies de interés mediante un hisopo estéril y sembradas en placas de Petri estériles conteniendo medio LB pH 7.0. Cada muestreo se hizo por duplicado en placas conteniendo CH y CH/NA. Las placas fueron incubadas en estufa de cultivo a 30 °C hasta que se observó crecimiento bacteriano. Una vez que obtenidas las colonias, cada fue repicada a una nueva placa con medio fresco LB, sólido a pH 7.0. Las placas fueron mantenidas por repiques sucesivos. Posteriormente a fin de preservar las cepas aisladas se conservaron en una solución de glicerol al 25 % a -20 °C.

Microscopía Electrónica

Tanto para el estudio *in-situ* de microbiomas presentes en muestras recolectadas como de las cepas aisladas se utilizaron métodos de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) utilizando equipamiento y protocolos puestos a punto en el Centro de Investigaciones y Servicios de Microscopía Electrónica CISME UNT-CONICET (Albarracín et al., 2005; Albarracín et al., 2008; Albarracín et al., 2016; Bequer-Urbano et al., 2013; Farias et al., 2013; Toneatti et al., 2017).

Para el estudio de las colonias en el cultivo, de las placas con medio LB sólido se tomaron pequeños bloques de 5 mm de lado conteniendo las colonias de interés que fueron colocados en fijador Karnovsky. Por otro lado, para el análisis de la morfología de las bacterias aisladas se llevó a cabo la siembra en medio LB líquido (Triptona 1 %, NaCl 1 %, Extracto de levadura 0,5 %) a pH 7. Las muestras se dejaron crecer en agitación constante (180 r.p.m a 30°C) durante 24 h (Biosan, Orbital Shaker-Incubator ES-20). A continuación, 10 mL de medio líquido de cada una de las cepas en estudio con una Densidad Óptica (DO) de 0,6 lo cual corresponde a la fase de crecimiento exponencial, fueron centrifugados a 3500 r.p.m durante 15 min. El *pellet* fue resuspendido en solución fisiológica estéril (NaCl 0,9 %) y centrifugado nuevamente a 3500 r.p.m durante 15 minutos. Se repitió el último paso y finalmente el pellet fue resuspendido en 1,5 mL de fijador Karnovsky. La fijación se realizó durante 24 h. Desde este punto, todas las muestras (cintas de papel, colonias aisladas en agar, bacterias crecidas en medio líquido) siguieron el mismo protocolo de procesamiento para su observación mediante MEB. Las muestras fueron deshidratadas por pasaje de las muestras en una batería de alcoholes de graduación creciente (30°, 50°, 70°, 90°, 100°) de 10 min cada uno empleando una placa de multipocillos. En el caso de los fragmentos de agar y las muestras en medio líquido fueron colocados sobre cubreobjetos redondos dispuestos dentro de los pocillos de las placas. Los fragmentos de cintas fueron colocados directamente dentro de los pocillos. Luego las muestras fueron retiradas y colocadas en gradillas de metal donde se realizaron dos pasajes sucesivos de 10 min cada uno en acetona 100 %. A continuación, se realizó el punto crítico de secado en equipo Denton Vacuum modelo DCP-1. El montaje de las muestras se efectuó sobre *stubs* de aluminio (soporte) que en su superficie tienen una cinta adhesiva conductora doble faz de carbón. Posteriormente, cada muestra fue recubierta con oro (*coating*) en un Ion Sputter Marca JEOL modelo JFC-1100. La observación se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido Marca Zeiss modelo SUPRA 55VP. Para la obtención de imágenes se empleó el modo de detección de electrones secundarios (SE2), a un voltaje de 3 kV. La Figura 1 esquematiza el procesamiento de las muestras para su observación mediante MEB.

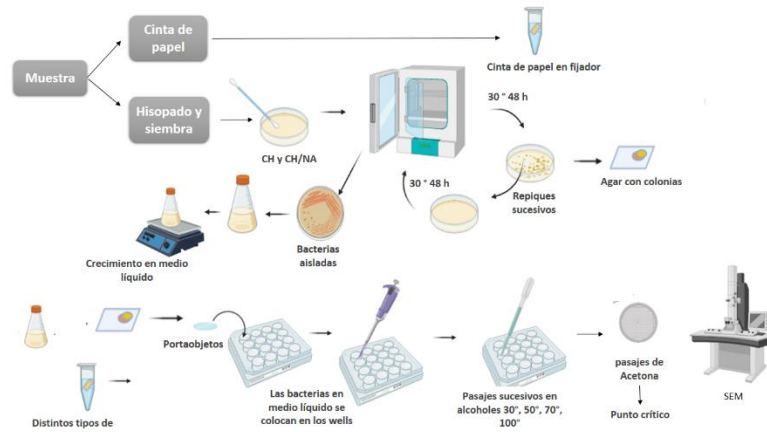


Figura 1 Esquema representativo mostrando el proceso llevado a cabo para el estudio de cepas aisladas y comunidades microbianas *in situ* mediante MEB.

RESULTADOS

Biofilms

El uso de la cinta de papel para el muestreo de superficies permitió obtener gran información sobre los microbiomas *in situ*. El análisis de las mismas por MEB reveló la presencia de comunidades microbianas formadoras de *biofilms* en diversas superficies de los laboratorios del Banco de Sangre. Las mismas fueron obtenidas de la mesada de trabajo de Biología Molecular, de las paredes laterales internas de la centrifuga del laboratorio de Producción y del interior del agitador plaquetario del laboratorio de Distribución. Todos los *biofilms* detectados presentaron una organización arquitectónica compleja caracterizada por la disposición de los microorganismos en un arreglo tridimensional rodeados de abundante material extracelular. Los *biofilms* provenientes de la mesada de trabajo de Biología Molecular presentaron cocos de diversos tamaños dispuestos entre abundante material extracelular (figura 2). Los *biofilms* provenientes de la centrifuga mostraron una estructura tridimensional donde las bacterias se dispusieron en capas. Interesantemente, se distinguió la formación de estructuras filamentosas y tubulares (figura 3). Por otro lado, los *biofilms* obtenidos del agitador plaquetario de distribución se encontraron constituidos por un único tipo de bacterias con una morfología consistente con cocos, inmersas en abundante material extracelular (figura 4). Además de los *biofilms*, el estudio de las cintas permitió identificar la presencia de microorganismos aislados o conformando pequeños grupos (figura 5). De los equipos de biología molecular se detectaron bacilos formando hileras. Del aire acondicionado de producción se obtuvieron cocos y coco-bacilos solos así como también bacilos en pequeños grupos.

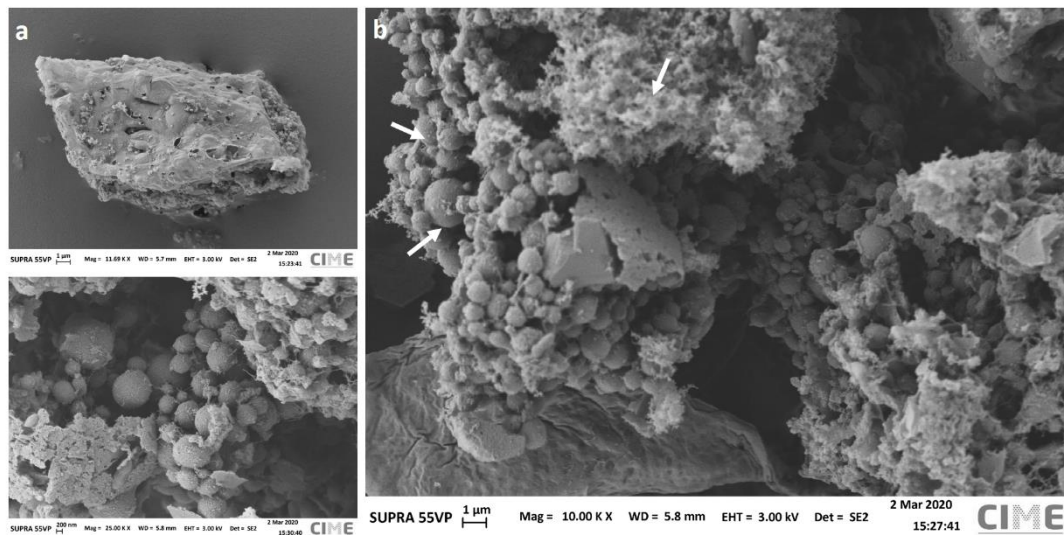


Figura 2 *Biofilms* detectados *in situ* en la mesada de trabajo del laboratorio de Biología Molecular. Flechas señalan los microorganismos de diferente morfología inmersos en material extracelular (b).

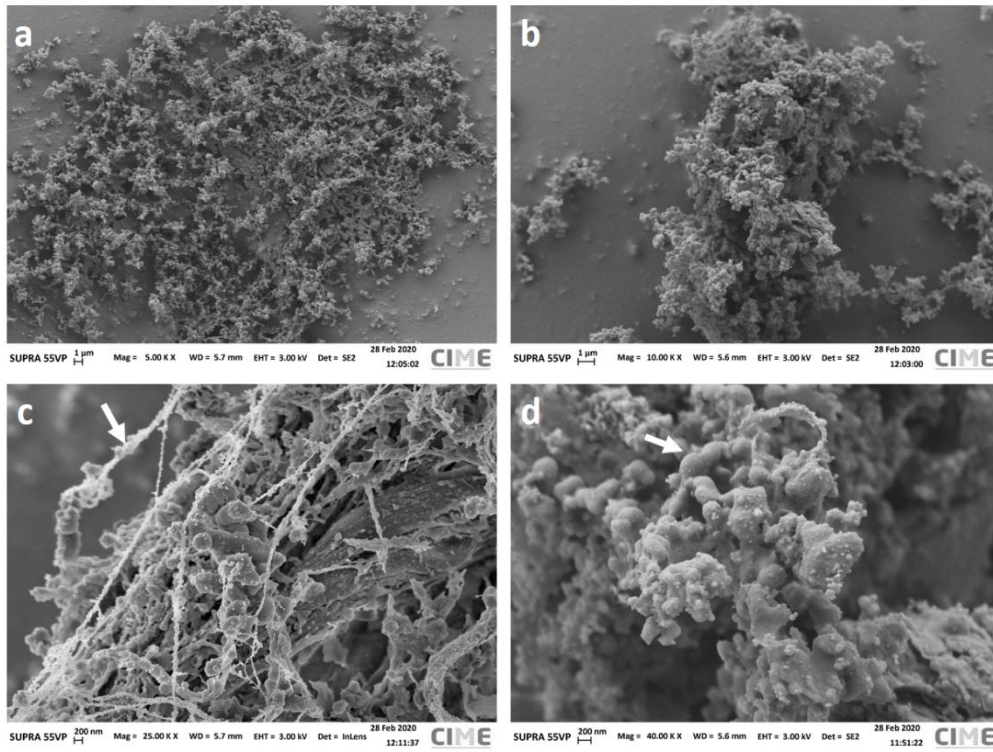


Figura 3 *Biofilms* detectados *in situ* en la centrifuga del laboratorio de Producción. Flechas señalan microorganismos inmersos en material extracelular (c y d).

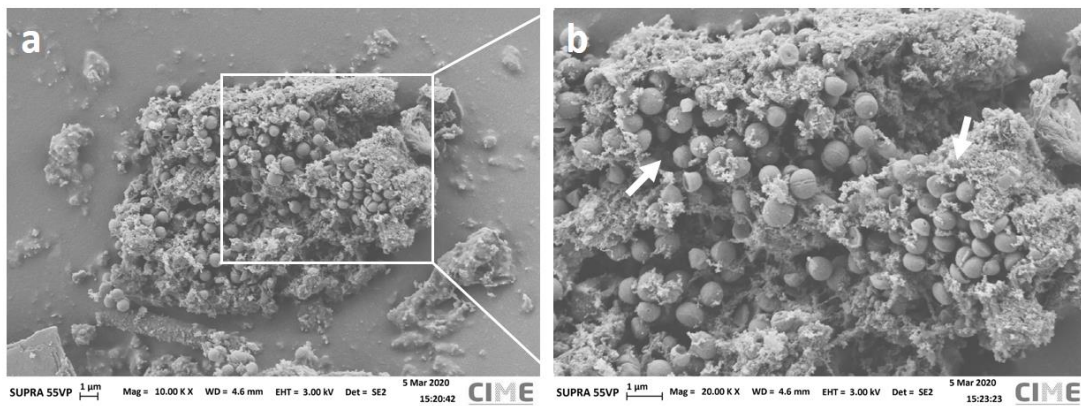


Figura 4 *Biofilms* detectados *in situ* en el agitador plaquetario del laboratorio de Distribución. b Micrografía a gran aumento correspondiente al recuadro en a. flechas señalan los microorganismos inmersos en material extracelular (b).

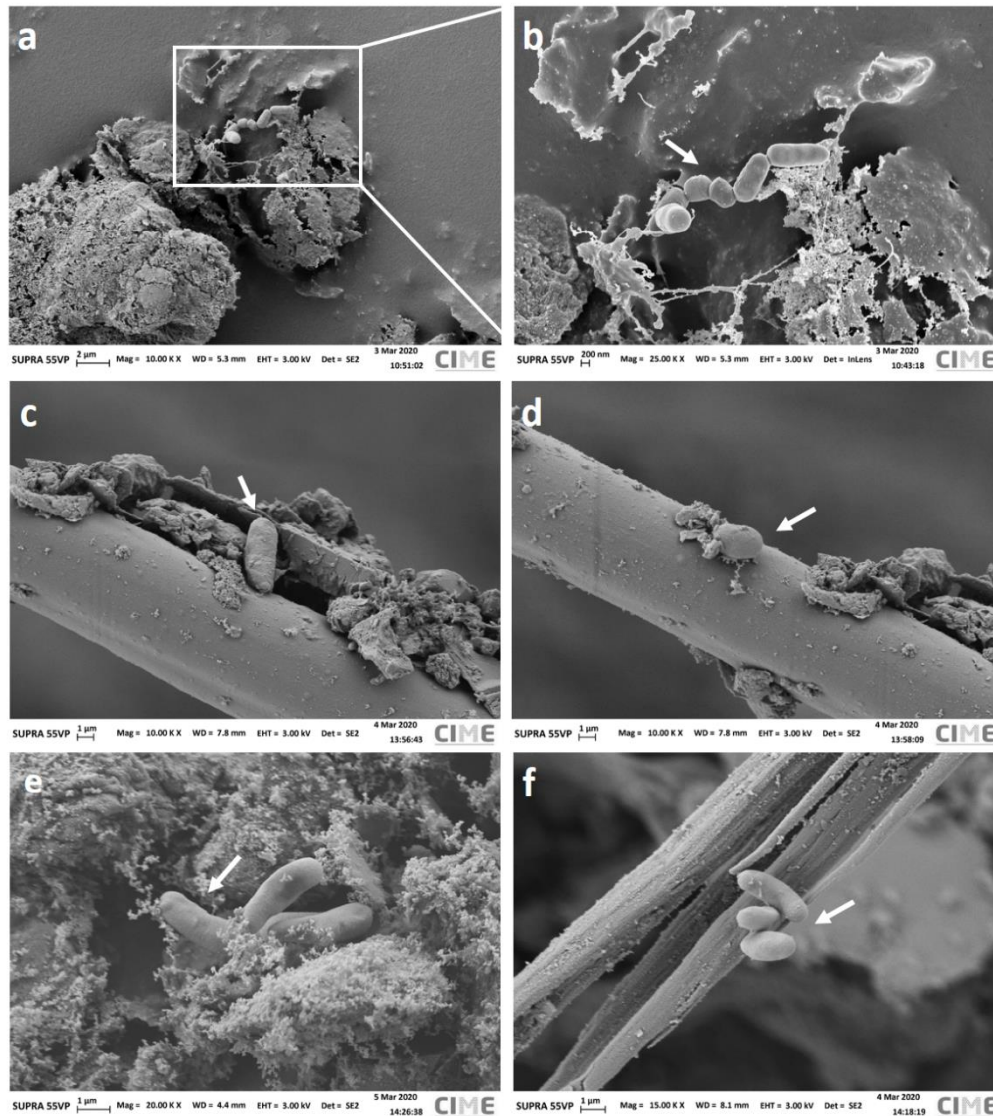


Figura 5 Microorganismos detectados *in situ*. En equipos del laboratorio de Biología Molecular (a y b) y del aire acondicionado de Producción (c-d).

Interacciones bacterianas

El análisis de los cultivos primarios permitió observar que algunas colonias establecían contactos estrechos entre ellas creciendo próximas una a la otra. La aplicación de MEB permitió analizar en detalle las características de la interacción en los puntos de contacto lo cual reveló un amplio espectro de relaciones entre las colonias. A partir de la mesada de reactivos de Biología Molecular fue posible aislar dos interacciones bacterianas, una a partir de placas con medio LB (CH) y otra a partir de placas con medio LB (CH/NA). La primera mostró cocos de diferente tamaño y el punto de contacto entre ambos donde se detectó una notable cantidad de material extracelular (figura 6). El estudio de la interacción obtenida de la placa CH/NA mostró que las bacterias interactuantes presentaban fenotipos claramente diferenciables; por un lado bacilos cortos y por otro bacilos largos. De modo interesante se evidenció que en el punto de contacto prevalecían bacterias con una forma distintiva y característica de huso, que no se corresponde con los fenotipos prevalentes en ambas colonias. Se observó además un incremento en el material extracelular (figura 7). Además se obtuvieron colonias interactuantes de placas con medio LB (CH) provenientes del aire acondicionado de Producción. El análisis a gran magnificación mostró que las bacterias interactuantes presentaban morfologías distintivas ya que se trataba de cocos y bacilos (figura 8). El punto de contacto pudo verse como un surco dentro del cual se disponen ambos tipos bacterianos inmersos en material extracelular.

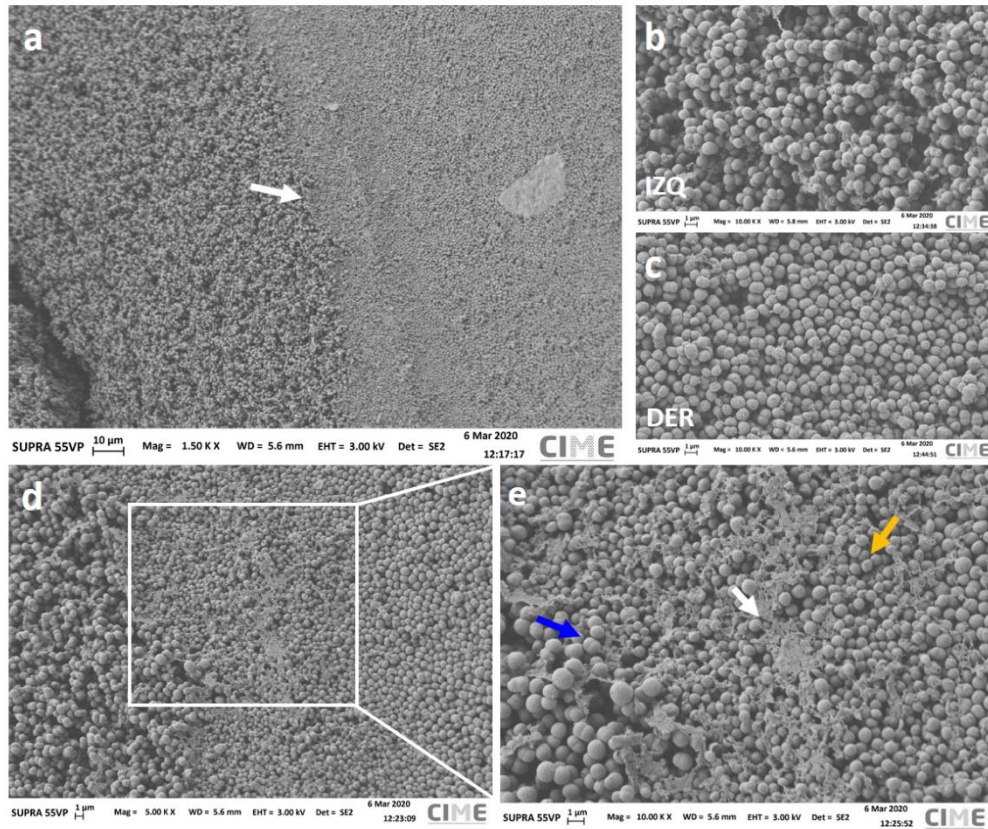


Figura 6 Interacción bacteriana obtenida de placas CH/NA de la mesada de reactivos de Biología Molecular. Flechas blancas señalan el sitio de contacto entre dos colonias (a y e) caracterizado por abundante material extracelular (e). Flecha azul, bacterias ubicadas a la izquierda (IZQ) (b); flecha amarilla bacterias a la derecha (DER) (c). e Micrografía a gran aumento correspondiente al recuadro en d.

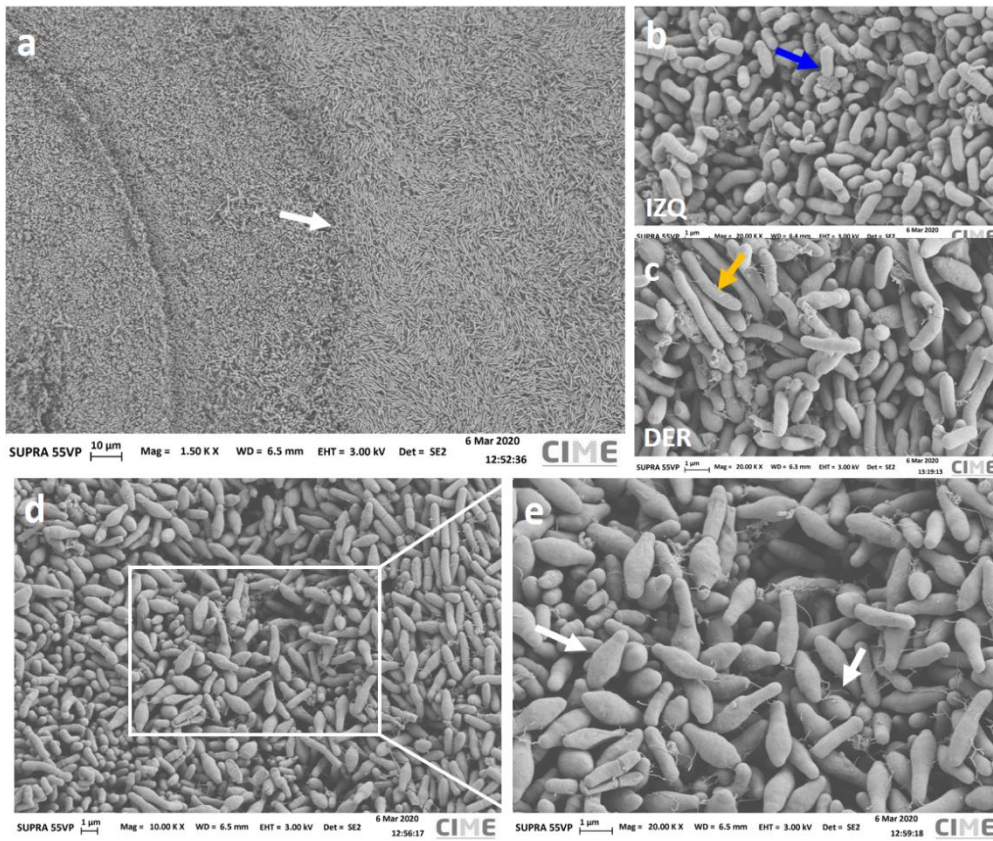


Figura 7 Interacción bacteriana en cultivos CH de la mesada de reactivos de Biología Molecular. Flechas blancas señalan el sitio de contacto entre dos colonias (a) con bacterias en forma de huso (e). Flecha azul, bacterias ubicadas a la izquierda (IZQ) (b); flecha amarilla bacterias a la derecha (DER) (c). e Micrografía a gran aumento correspondiente al recuadro en d.

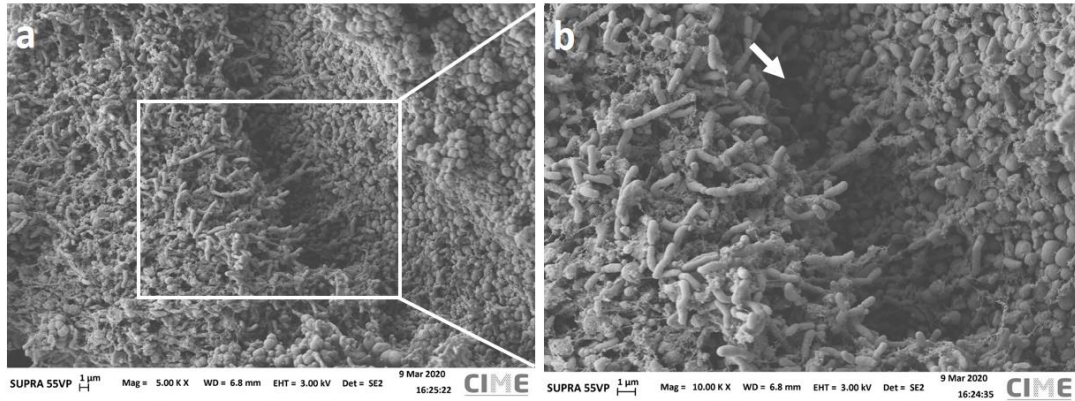


Figura 8 Interacción bacteriana en cultivos CH del aire acondicionado de Producción. Flecha señala el sitio de contacto entre dos colonias (b). b Micrografía a gran aumento correspondiente al recuadro en a.

Aislamiento de microorganismos predominantes

El muestreo de superficies permitió aislar un total de 45 colonias. 25 fueron aisladas del laboratorio de Biología Molecular, 15 del servicio de producción y 5 del servicio de Distribución (figura 9). La observación macroscópica de los cultivos reveló que los microorganismos predominantes exhiben una gran diversidad en cuanto a las características fenotípicas de las colonias obtenidas (tablas 1, 2 y 3).

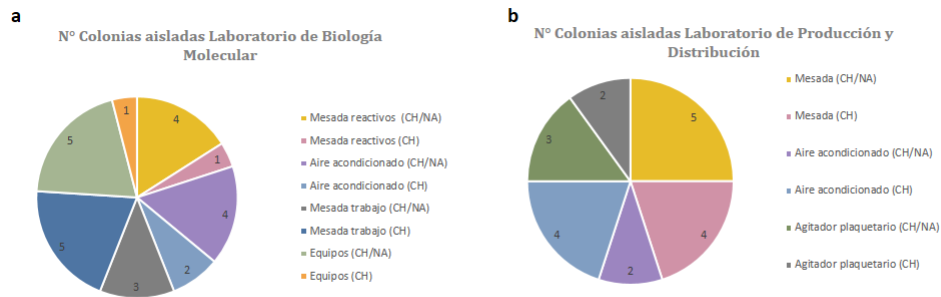


Figura 9 Gráficos indicando la cantidad de colonias aisladas a partir de cada sitio de muestreo.

Tabla 1. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas del servicio de Biología Molecular.

Cepas aisladas Biología Molecular	Características macroscópicas	
	Color reverso	Superficie y textura
MR-BM1 CH/NA	Naranja intenso	Liso y mucoide
MR-BM2 CH/NA	Crema claro	Liso y mucoide
MR-BM3 CH/NA	Amarillo tenue	Opaco y húmedo
MR-BM4 CH/NA	Crema suave	Liso y mucoide
MR-BM1 CH	Marrón claro	Liso y mucoide
AA-BM1 CH/NA	Amarillo tenue	Opaco y húmedo
AA-BM2 CH/NA	Amarillo intenso	Liso y mucoide
AA-BM3 CH/NA	Crema claro	Opaco y húmedo
AA-BM4 CH/NA	Amarillo tenue	Liso y mucoide
AA-BM1 CH	Amarillo brillante	Liso y mucoide
AA-BM2 CH	Negro	Rugoso y seco
ME-BM1 CH/NA	Amarillo claro	Liso y mucoide
ME-BM2 CH/NA	Crema	Liso y mucoide
ME-BM3 CH/NA	Amarillo claro	Liso y mucoide
ME-BM1 CH	Beige claro	Liso y mucoide
ME-BM2 CH	Amarillo tenue	Liso y mucoide
ME-BM3 CH	Blanco	Rugoso y seco, polvoroso
ME-BM4 CH	Crema claro	Opaco y húmedo
ME-BM5 CH	Marrón claro	Frágil y viscoso
E-BM1 CH/NA	Marrón claro	Liso y mucoide
E-BM2 CH/NA	Crema	Liso y mucoide
E-BM3 CH/NA	Crema	Opaco y húmedo
E-BM4 CH/NA	Amarillo brillante	Liso y mucoide
E-BM 5 CH/NA	Beige translúcido	Liso y mucoide
E-BM1 CH	Crema	Liso y mucoide

Colonias obtenidas de la mesada de reactivos (MR-BM), mesadas de trabajo (ME-BM) aire acondicionado (AA-BM) y de los equipos (E-BM). CH (Cicloheximida). CH/NA (Cicloheximida/Acido Nalidíxico).

Tabla 2. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas del servicio de Producción.

Cepas aisladas de Producción	Características macroscópicas	
	Color reverso	Superficie y textura
M-PRO1 CH/NA	Naranja claro	Liso y mucoide
M-PRO2 CH/NA	Naranja intenso	Liso y mucoide
M-PRO3 CH/NA	Blanca	Rugosa y seca
M-PRO4 CH/NA	Beige claro	opaco y húmedo
M-PRO5 CH/NA	Amarillo intenso	Liso y mucoide
M-PRO1 CH	Beige claro	Opaco y húmedo
M-PRO2 CH	Beige claro	Lisa y mucoide
M-PRO3 CH	Amarillo	Opaco y húmedo
M-PRO4 CH	Crema claro	Lisa y mucoide
AAC-PRO1 CH/NA	Crema	Opaco y húmedo
AAC-PRO2 CH/NA	Naranja intenso	Liso y mucoide
AAC-PRO1 CH	Amarillo claro	Liso y mucoide
AAC-PRO2 CH	Crema claro	Liso y mucoide
AAC-PRO3 CH	Naranja tenue	Liso y mucoide
AAC-PRO4 CH	Beige claro	Rugoso y seco

Colonias obtenidas a partir de la mesada (M-PRO) y del aire acondicionado, (AA-PRO). CH (Cicloheximida). CH/NA (Cicloheximida/Acido Nalidixico).

Tabla 3. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas del servicio de Distribución.

Cepas aisladas de Distribución	Características macroscópicas	
	Color reverso	Superficie y textura
A-PLAQ-PRO1 CH/NA	Naranja claro	Opaco y Húmedo
A-PLAQ-PRO2 CH/NA	Amarillo tenue	Opaco y Húmedo
A-PLAQ-PRO3 CH/NA	Crema	Opaco y Húmedo
A-PLAQ-PRO1 CH	Beige	Liso y mucoide
A-PLAQ-PRO2 CH	Beige oscuro	Liso y mucoide

Colonias obtenidas a partir del agitador plaquetario de Distribución (A-PLAQ_PRO). CH (Cicloheximida). CH/NA (Cicloheximida/Acido Nalidixico).

Fenotipo bacteriano por MEB

El análisis mediante MEB de las bacterias luego de que crecieron en cultivo líquido reveló detalles de su fenotipo, morfología y comportamiento. Interesantemente, la observación por MEB mostró la asombrosa capacidad de las bacterias de formar agregados en el medio líquido estableciendo conexiones de diversa índole. Coco-bacilos provenientes de cultivos CH de la mesada de trabajo de Biología Molecular forman agregados caracterizados por aglomerados bacterianos en los cuales las células se unen entre ellas mediante la presencia de abundante material extracelular entre las bacterias (figura 10, b). A partir de cultivos CH provenientes de los equipos de Biología Molecular se aislaron bacterias con un fenotipo peculiar, bacilos cortos con extremos aplanados y superficie rugosa. Los mismos se agrupan mediante el establecimiento de estructuras tubulares que se extienden desde la superficie bacteriana y se disponen a modo de red estableciendo conexiones cortas entre bacterias proximales y también como filamentos largos sobre bacterias alejadas (figura 10, a). Cocos provenientes de cultivos CH/NA obtenidos de los equipos de Biología Molecular se organizan en tétradas, donde diadas se conectan mediante estructuras filamentosas, unas células presentan la superficie lisa (figura 11, a) mientras que otras presentan numerosas estructuras filamentosas sobre su superficie. A su vez estas estructuras parecen implicadas en la conformación de agrupaciones mayores (figura 11, b). A partir de las mesadas de reactivos de Biología Molecular se observaron bacterias con morfología de coco-bacilos (figura 11, c) y cocos organizadas en tétradas y conectadas mediante filamentos muy finos, y coco-bacilos que también conformaron agregados (figura 11, d).

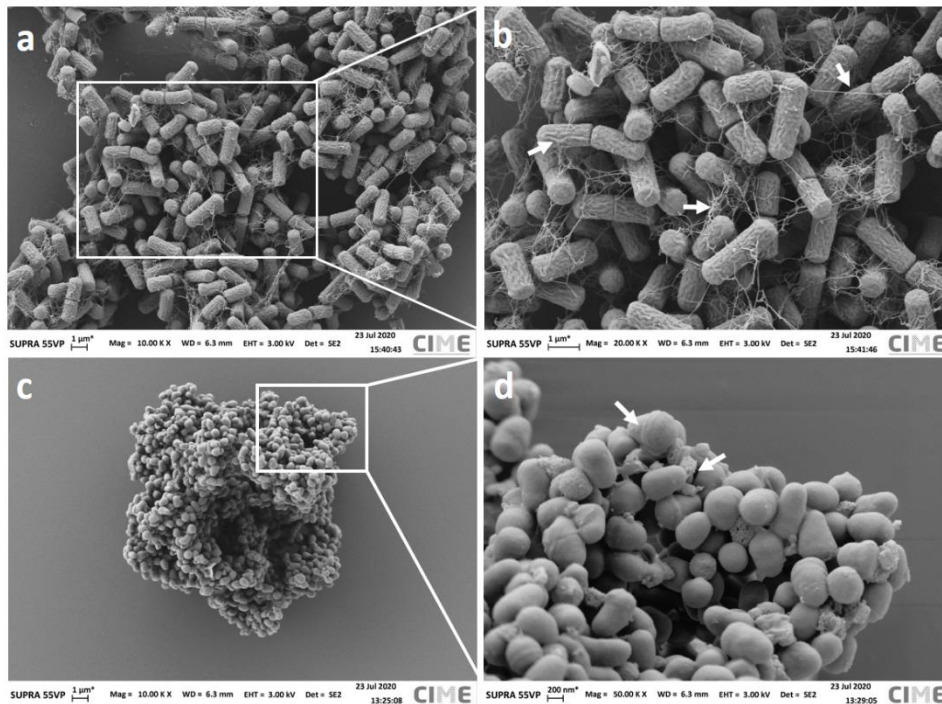


Figura 10 Agregados bacterianos de cultivos en medio líquido. Bacterias de los equipos (CH) (a y b) y de la mesada de trabajo (CH) (c y d) de Biología Molecular. b y d mayor magnificación correspondientes a los recuadros en a y c respectivamente. Flechas indican estructuras de conexión entre las bacterias.

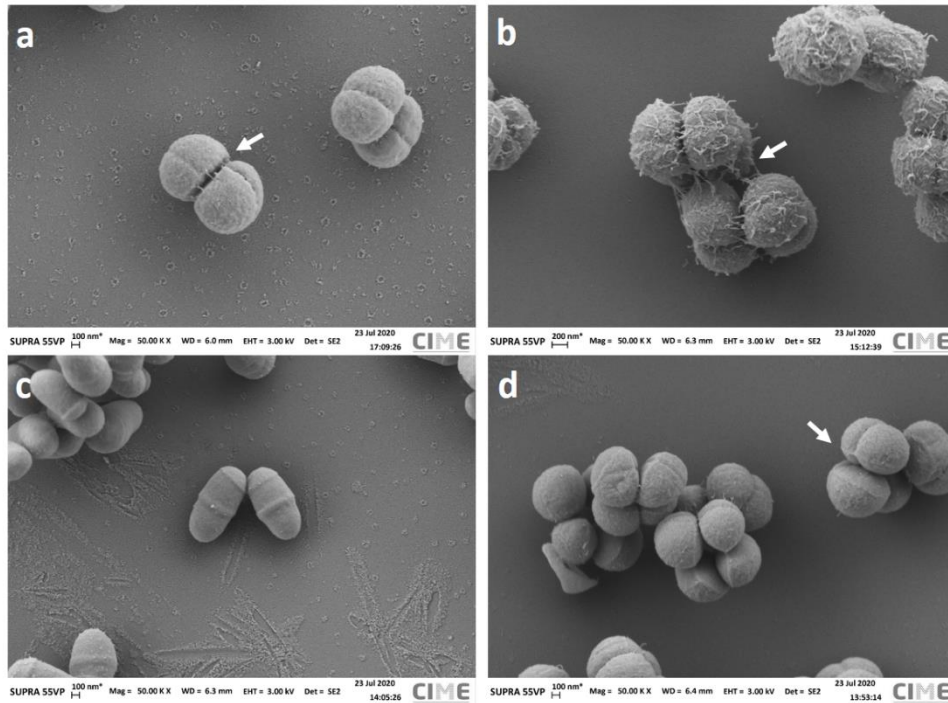


Figura 11 Morfología de bacterias a gran magnitud correspondientes a cultivos en medio líquido provenientes de los equipos de BM (CH/NA) (a y b) y de mesada de reactivos de BM (CH/NA) (c y d). Flechas indican estructuras de conexión entre las bacterias.

DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado como microbiomas presentes en los centros médico-asistenciales y hospitalarios se encuentran relacionados directamente con el riesgo de contraer enfermedades infecciosas (Lax y Gilbert 2015). Además, existe un aumento en la tasa de mortalidad asociada a bacterias resistentes a los antibióticos (Benngtsson-Palme et al., 2007; Pal et al., 2016). Teniendo en cuenta estos conceptos, surge la necesidad de conocer y caracterizar los microbiomas de los sistemas de salud. El propósito de este trabajo fue analizar comunidades microbianas del Banco Central de Sangre de Tucumán mediante métodos de cultivo y aislamiento así como también mediante tecnologías de microscopía de alta resolución como MEB.

En la actualidad, la identificación y caracterización de microbiomas en el ámbito de la salud es un campo en constante crecimiento y expansión. Para ellos se aplican diversas estrategias de análisis en especial métodos moleculares como PCR *real time* (Caselli et al., 2016; Caselli et al., 2018; Davidson & Epperson, 2018; Caselli et al., 2019; D'Accolti et al., 2019) y más recientemente de secuenciación masiva (Comar et al., 2019). Por otro lado, los métodos de imágenes han permitido obtener información de las interacciones entre diferentes microorganismos tanto entre ellos como con el ambiente que los rodea (Zhang *et al.*, 2019). Sin embargo, hasta el presente no existen estudios referidos a caracterización de microbiomas en el ámbito de la salud en nuestra provincia. Nuestro estudio se enfocó en analizar microbiomas de superficie *in situ*, mediante el empleo de cinta de papel y también a través del aislamiento de predominantes mediante hisopado y siembra y posterior cultivo.

Nuestro análisis por MEB permitió detectar la formación de estructuras de organización tridimensional complejas con microorganismos agrupados, dispuestos en capas e inmersos en un material extracelular consistente con *biofilms*. Los mismos se obtuvieron de superficies de la mesada de Biología Molecular, en la centrifuga de Producción y en el agitador magnético de Distribución. Los *biofilms* han sido descritos como un tipo especial de microbioma organizado en capas (Vinh *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 2012; Wimpenny, 2009), o como agregados de células bacterianas rodeados de matriz extracelular con diversos componentes (Sager et al., 2015). En cuanto a reportes de estas estructuras en el ámbito de la salud, se han detectado en superficies de terapia intensiva en hospitales de Brasil (Costa et al, 2019). Se han descrito además *biofilms* colonizando diversos dispositivos médicos (Talsma et al, 2007; Roberts et al.,

2013; Petrachi et al., 2017). Nuestro trabajo es el primero que describe la presencia de *biofilms* en áreas de la salud pública en nuestra provincia.

El hallazgo de *biofilms* en el laboratorio de Biología Molecular resulta interesante dado que sus superficies están sujetas a un exhaustivo proceso de limpieza diaria mediante el empleo de etanol al 70 %, hipoclorito de sodio 0,5 %, descontaminante de superficie DNA AWAY (Molecular BioProducts, Inc.), y detergente *neodisher MediClean* al 1-2 % (Chemische Fabrik Dr. Weigert, GmbH). Sin embargo se ha visto que las bacterias con capacidad de formar *biofilms* son sumamente difíciles de eliminar debido a una combinación del efecto mecánico de varias capas sumado a la capacidad de resistencia a los antibióticos (Percival et al., 2010); incluso pueden permanecer viables en las superficies luego del tratamiento con sustancias antimicrobianas (Hu et al., 2019). Esto podría explicar la obtención de microorganismos aislados o en pequeños grupos además de los *biofilms*.

El desarrollo de los *biofilms* es un proceso complejo, que se inicia con la adherencia de bacterias planctónicas a una superficie con la consiguiente formación de microcolonias (Donné y Dewilde, 2015). Se produce un incremento en la expresión génica de estructuras de adhesión celular entre ellas pilis que permiten una unión más fuerte. Luego las bacterias comienzan a proliferar y secretar una matriz extracelular compuesta de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas (Billings et al., 2015; Santajit y Indrawattana, 2016). Nuestras micrografías de *biofilms* mediante MEB permiten observar el abundante material extracelular de los mismos dentro del cual se disponen las bacterias. La matriz extracelular crea una barrera de difusión física (Jefferson et al., 2005; Singh et al., 2010), que encapsula y protege a la comunidad bacteriana frente a la respuesta inmune del hospedador, dificulta o impide la acción antibiótica y otorga alta adherencia del microorganismo a una determinada superficie (Sager et al., 2015). De esta manera, microorganismos con habilidad para formar *biofilms* poseen resistencia a antibióticos (Høiby et al., 2010; Hall y Mah, 2017; Zheng et al., 2018). Además estas estructuras ofrecen protección de las agresiones fisicoquímicas, metales pesados, acidez del medio, cambios de hidratación y salinidad, fagocitosis y luz ultravioleta (Jayaraman y Wood, 2008; Lebeaux et al., 2008.). En el laboratorio de Biología Molecular, además de la desinfección de las superficies se emplea luz ultravioleta (UV) a fin de complementar la limpieza del ambiente ya que garantiza la destrucción rápida y eficiente del ADN de los microorganismos mediante un proceso físico. La formación de *biofilms* en este laboratorio podría estar relacionada con la capacidad de supervivencia bajo estas condiciones. Además mediante la aplicación de MEB observamos que bacterias que crecieron en medio líquido provenientes de los equipos y de las mesadas de Biología Molecular eran capaces de formar agregados entre ellas. En este tipo de organización, las bacterias establecieron conexiones entre ellas mediante estructuras filamentosas. Estas asociaciones podrían explicar la unión en estructuras tridimensionales. Estructuras similares han sido descritas y caracterizadas como nanotubos. Las primeras investigaciones fueron llevadas a cabo por Dubey et al 2011, y posteriormente se han dilucidado aspectos inherentes a su arquitectura y función (Dubey et al., 2016; Baidya et al., 2018). Observamos que una de las bacterias aisladas de los equipos de BM (EBM1CH) forma estructuras tubulares que se extienden a modo de red entre las células, consiste en estructuras cortas que conectan bacterias cercanas y otras largas que conectan estructuras más alejadas. Además estas estructuras conectan a las bacterias al soporte sobre el que se realiza el estudio. La arquitectura y organización de estas estructuras permiten sugerir que puedan tratarse de nanotubos.

La microscopía electrónica ha permitido establecer la estructura y diversidad de la gran biodiversidad de taxones en los microbiomas permitiendo detectar interacciones entre diversos miembros de las comunidades (Farias et al., 2013; Toneatti et al., 2017). La observación macroscópica de los cultivos, permitió observar que algunas colonias crecían muy próximas a otras. Con el propósito de indagar sobre estas interacciones se analizaron por MEB. Fue posible detectar particularidades en los puntos de contacto caracterizados por cambios en la morfología celular y grandes cantidades de matriz extracelular. Este incremento de matriz extracelular en los puntos de contacto podría responder a señalizaciones Quorum Sensing (QS). Mecanismo adoptado por comunidades bacterianas relacionado con la densidad de población, o por señales simples producidas por bacterias. Es utilizado en comunicaciones célula-célula o en señales producidas por bacterias en distintos estados de crecimiento lo que les permite regular la expresión génica independiente de la densidad celular. Por ejemplo *E. coli* produce indol en la fase estacionaria de crecimiento que actúa como una señal, capaz de modificar funciones celulares, tales como patogenicidad, movilidad, atenuar adherencia y cambios de la expresión génica (Jayaraman y Wood, 2008; LaSarre y Federle, 2013). Muchas de estas señales se generan como respuesta al estrés ambiental incluido el provocado por antibacterianos (Gill et al., 2015). El sistema QS está presente en bacterias de una misma especie o entre especies distintas y es regulado por diferentes señales químicas que son sintetizadas y secretadas por varias bacterias (Jayaraman y Wood, 2008; Que et al., 2013). El desarrollo de *biofilms* en respuesta a QS es un proceso íntimamente relacionado (Solano et al., 2014). E implica la síntesis de componentes de matriz extracelular (Tolker-Nielsen, 2015). Las interacciones observadas en el

cultivo y las estructuras observadas a partir de cultivos en cultivo podrían estar reflejando las relaciones establecidas en los *biofilms*.

La realización de este trabajo permitió detectar comunidades microbianas *in situ* presentes en un área referente a la salud humana como lo es el Banco de Sangre de la provincia de Tucumán. La aplicación de técnicas microscópicas avanzadas (MEB) ha permitido analizar la ultra estructura de los microbiomas. Fue posible poner en evidencia aspectos de la organización, relación y comportamiento de microorganismos lo cual constituye el primer paso para su caracterización así como para establecer su posible relación con enfermedades humanas. Los resultados presentados posicionan a la microscopía electrónica como una poderosa herramienta para el análisis de microbiomas en el ámbito de la salud y contribuye a fortalecer el conocimiento existente sobre ambientes poco explorados y al entendimiento de las interacciones microbianas, en ambientes relacionados a la salud humana.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de San Pablo-T para los proyectos ISYCAV-841 e ISYCAV-842 que permitieron el desarrollo de este trabajo. Se agradece además a la Dra. Felicitas Agote, directora del Banco Central de Sangre “Dr. César Guerra”, (PRIS-SI.PRO.SA) y a la Dra. Graciela Lavado, Jefa de División del PRIS-SI.PRO.SA.

VHA es Investigadora del CONICET, MCD es Becaria Posdoctoral del CONICET, GSF es Becaria Doctoral del CONICET, ANN es Becaria Doctoral del CONICET, GM es responsable del Laboratorio de Biología Molecular del Banco Central de Sangre, LM es Técnico Profesional.

Las micrografías usadas en este trabajo fueron tomadas en el Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME), perteneciente a la Universidad Nacional de Tucumán (UNT) y al CCT, CONICET, Tucumán-Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarracín, V.H., Amoroso, M.J., Abate, C. M., 2005. Isolation and characterization of indigenous copper resistant actinomycete strains. *Chemie der Erde/ Geochemistry*, 65 (1) 145-156.
- Albarracín, V.H., Gärtner, W., Farias, M.E. 2016. Forged under the sun: life and art of extremophiles from Andean Lakes. *Photochemistry and Photobiology*. 92: 14-28.doi: 10.1111/php.12555.
- Albarracín, V.H., Winik, B., Kothe, E., Amoroso, M.J., Abate, C.M. 2008. Copper bioaccumulation by the actinobacterium *Amycolatopsis* sp. AB0. *Journal of Basic Microbiology*, 48: 323-330.
- Baidya AK, Bhattacharya S, Dubey GP, Mamou G, Ben-Yehuda S. 2018. Bacterial nanotubes: a conduit for intercellular molecular trade. *Curr Opin Microbiol*.42:1-6.
- Bengtsson-Palme, J.; Larsson, D.G.J.; Kristiansson, E. 2017. Using metagenomic to investigate human and environmental resistomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2690–2703.
- Bequer Urbano, S., Albarracín, V.H., Ordoñez, O.F., Farias, M.E., Alvarez, H.A. 2013. Lipid storage in High-Altitude Andean Lakes extremophiles and its mobilization under stress conditions in *Rhodococcus* sp. A5, a UV-resistant actinobacterium. *Extremophiles*, 17: 217-227.
- Billings N, Birjiniuk A, Samad TS, Doyle PS, Ribbeck K. 2015. Material properties of biofilms-a review of methods for understanding permeability and mechanics. *Rep Prog Phys*. 78(3):036601.
- Bryers, J.D. 2008. Medical Biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 1–18. 6.
- Caselli, E.; Arnoldo, L.; Rognoni, C.; D’Accolti, M.; Soffritti, I.; Lanzoni, L.; Bisi, M.; Volta, A.; Tarricone, R.; Brusaferrero, S.; et al. 2019. Impact of a probiotic-based hospital sanitation on antimicrobial resistance and HAI-associated antimicrobial consumption and costs: A multicenter study. *Infect. Drug Resist.* 12, 501–510.
- Caselli, E.; Brusaferrero, S.; Coccagna, M.; Arnoldo, L.; Berloco, F.; Antonioli, P.; Tarricone, R.; Pelissero, G.; Nola, S.; La Fauci, V.; et al. 2018. Reducing healthcare-associated infections incidence by a probiotic-based sanitation system: A multicentre, prospective, intervention study. *PLoS ONE*. 13, e0199616.
- Caselli, E.; D’Accolti, M.; Vandini, A.; Lanzoni, L.; Camerada, M.T.; Coccagna, M.; Branchini, A.; Antonioli, P.; Balboni, P.G.; Di Luca, D.; et al. 2016. Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation. *PLoS ONE*. 11, e0148857.
- Comar M; D’Accolti M; Cason C; Soffritti I; Campisciano G; Lanzoni L; Bisi M; Volta A; Mazzacane S; Caselli E. 2019 Introduction of NGS in Environmental Surveillance for Healthcare-Associated Infection Control. *Microorganisms* 16; 7(12):708.

- Comeau AM, Harding T, Galand PE, Vincent WF, Lovejoy C. 2012. Vertical distribution of microbial communities in a perennially stratified Arctic lake with saline, anoxic bottom waters. *Sci Rep.* 2012; 2:604.
- Costa DM; Johani K; Melo DS; Lopes LKO; Lopes Lima; Tipple AFV; Hu H; Vickery K. 2019. Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Lett Appl Microbiol.* 68(4):269-276.
- Cusumano CK, Hultgren SJ. 2009. Bacterial Adhesion—a source of alternate antibiotic targets. *IDrugs.* 12(11):699-705.
- D'Accolti, M.; Soffritti, I.; Mazzacane, S.; Caselli, E. 2019. Fighting AMR in the Healthcare Environment: Microbiome-Based Sanitation Approaches and Monitoring Tools. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1535.
- Davidson RM, Epperson LE. 2018. Microbiome Sequencing Methods for Studying Human Diseases. *Methods Mol Biol.* 1706:77-90.
- Dickey SW, Cheung GYC, Otto M. 2017. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat Rev Drug Discov.* 16(7):457-471.
- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 5(12):939-51.
- Donné J; Dewilde S. 2015. The Challenging World of Biofilm Physiology. *Adv Microb Physiol* 67:235-92.
- Dubey GP, Ben-Yehuda S. 2011. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell.* 2011 Feb 18; 144(4):590-600.
- Dubey GP, Malli Mohan GB, Dubrovsky A, Amen T, Tsipshtein S, Rouvinski A, Rosenberg A, Kaganovich D, Sherman E, Medalia O, Ben-Yehuda S. 2016. Architecture and Characteristics of Bacterial Nanotubes. *Dev Cell.* 2016 Feb 22; 36(4):453-61.
- Fahimipour AK, Ben Mamar S, McFarland AG, Blaustein RA, Chen J, Glawe AJ, Kline J, Green JL, et al. 2018. Antimicrobial Chemicals Associate with Microbial Function and Antibiotic Resistance Indoors. *mSystems.* 11; 3(6).
- Farias, M.E., et al., 2013. The discovery of stromatolites developing at 3570 m above sea level in a high-altitude volcanic lake Scompa, Argentinian Andes. *PLoS ONE* 8(1): e53497.
- Ferri, M.; Ranucci, E.; Romagnoli, P.; Giaccone, V. 2017. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 2857–2876.
- Gill EE; Franco OL; Hancock RE. 2015. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des.* 85(1):56-78. doi: 10.1111/cbdd.12478.
- Gire, S.K., Goba, A., Andersen, K.G., Sealfon, R.S.G., Park, D.J., Kanneh, L., et al. 2014. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* (80-). 345: 1369 LP-1372.
- Hall CW; Mah TF.(2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1; 41(3):276-301.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.* (10):R245-9.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.* 5(10): 245-249.
- Højby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 35(4):322-32.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 11; 292(5519):1115-8.
- Hu, J., Ben Maamar, S., Glawe, A.J., Gottel, N., Gilbert, J.A., Hartmann, E.M. 2019. Impacts of indoor surface finishes on bacterial viability. *Indoor Air.* 29(4): 551-562.
- Hugenholtz P, Tyson GW.(2008). Microbiology: metagenomics. *Nature.* 25; 455(7212):481-3.
- Jayaraman A, Wood TK. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng.* 10:145-67.
- Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. (2005). Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(6):2467-73.
- King GM. 2014. Urban microbiomas and urban ecology: how do microbes in the built environment affect human sustainability in cities? *J Microbiol.* 52(9):721-8.
- Knierim B, Luef B, Wilmes P, Webb RI, Auer M, Comolli LR, Banfield JF. (2012). Correlative microscopy for phylogenetic and ultrastructural characterization of microbial communities. *Environ Microbiol Rep.* 4(1):36-41.

- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon-sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* 79(17):5112-20.
- Kurth, D., Belfiore, C., Gorriti, M., Farias, M.E., Albarracín, V.H.* 2015. Genomic and proteomic evidences unravel the UV-resistome of the poly-extremophile *Acinetobacter* sp. Ver3. *Front. Microbiol.* 6: 328. doi: 10.3389/fmicb.2015.00328.
- LaSarre B, Federle MJ. 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 77(1):73-111.
- Lax, S., Sangwan, N., Smith, D., Larsen, P., Handley, K.M., Richardson, M., et al. 2017. Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital. *Sci. Transl. Med.* 9: eaah6500.
- Lax, S.; Gilbert, J.A. 2015. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. *Trends Mol. Med.* 21, 427–432.
- Marchesi JR, Ravel J. 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome.* 3(3):31.
- Mardis ER. 2011. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature.* 470 (7333):198-203.
- Nesme J, Achouak W, Agathos SN, Bailey M, Baldrian P, Brunel D, Frostegård Å, Heulin T, Jansson JK, et al. 2016. Back to the future of Soil Metagenomics. *Front Microbiol.* 10; 7:73.
- O'Hara, N.B., Reed, H.J., Afshinnkoo, E., Harvin, D., Caplan, N., Rosen, G., et al. 2017. Metagenomic characterization of ambulances across the USA. *Microbiome* 5: 125.
- O'Neill. 2014. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Antimicrob Resist.* 1-22.
- Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. 2012. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol.* 2:104.
- Pal, C.; Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D.G. 2016. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. *Microbiome.* 4, 54.
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 37(1):177-192.
- Percival SL, Thomas JG, Williams DW. 2010. Biofilms and bacterial imbalances in chronic wounds: anti-Koch. *Int Wound J.* 7(3):169-75.
- Percival, S.L.; Thomas, J.G.; Williams, D.W. 2010. *The World of Microbiology and Biofilmology.* In *Microbiology of Wounds*; CRC Press: London, UK. 1–58.
- Petrachi, T., Resca, E., Piccinno, M.S., Biagi, F., Strusi, V., Dominici, M., Veronesi, E. 2017. An Alternative Approach to Investigate Biofilm in Medical Devices: A Feasibility Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 14, 1587.
- Que YA; Hazan R; Strobel B; Maura D; He J; Kesarwani M; Panopoulos P; Tsurumi A; Giddey M; Wilhelmy J; Mindrinos MN; Rahme LG. 2013. A quorum sensing small volatile molecule promotes antibiotic tolerance in bacteria. *PLoS One.* 8(12):e80140.
- Rasuk. M.C., Ferrer, G.M., Kurth, D., Portero, L.R., Farias, M.E. And Albarracin, V.H. 2017. UV-resistant Actinobacteria from High-Altitude Andean Lakes: isolation, characterization and antagonistic activities. *Photochem Photobiol* 93: 865-880
- Reid, G. Biofilms in infectious disease and on medical devices. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1999, 11, 223–226.
- Roberts CG. 2013. The role of biofilms in reprocessing medical devices. *Am J Infect Control.* 41 (5 Suppl):S77-80.
- Sager M; Benten P, Engelhardt E; Gougoula C; Benga L. 2015. Characterization of Biofilm Formation in [*Pasteurella*] pneumotropica and [*Actinobacillus*] muris Isolates of Mouse Origin. *PLoS One.* 2; 10 (10):e0138778.
- Santajit S; Indrawattana N. 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens *Biomed Res Int.* 6:2475067.
- Seth, A.K.; Geringer, M.R.; Hong, S.J.; Leung, K.P.; Mustoe, T.A.; Galiano, R.D. 2017. In vivo modeling of biofilm-infected wounds: A review. *J. Surg. Res.* 2012, 178, 330–338. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14, 1587 7 of 7
- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. 2010. Enhanced production of exopolysaccharide matrix and biofilm by a menadione-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant. *J Med Microbiol.* 59(Pt 5):521-527.
- Smith, D., Alverdy, J., An, G., Coleman, M., Garcia-houchins, S., Green, J., et al. 2013. The Hospital Microbiome Project: Meeting Report for the 1st Hospital Microbiome Project Workshop on sampling design and building science measurements, Chicago. *Stand. Genomic Sci.* 112–117.
- Solano C, Echeverz M, Lasa I. 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* 96-104.

- Sultana, S.T.; Babauta, J.T.; Beyenal, H. 2015. Electrochemical biofilm control: A review. *Biofouling*, 31, 745–758.
- Talsma SS. 2007. Biofilms on medical devices. *Home Healthc Nurse*. 25(9):589-94.
- Tolker-Nielsen T. (2015). Biofilm Development. *Microbiol Spectr*. 2015 Apr; 3(2): MB-0001-2014.
- Toneatti, D. M., Albarracín, V. H., Flores, R., Polerecky, L., Farias, M.E. 2017. Stratified bacterial diversity along physico-chemical gradients in High-Altitude modern stromatolites. *Frontiers in Microbiology*, 8: 646.
- Van Kleef, E.; Robotham, J.V.; Jit, M.; Deeny, S.R.; Edmunds, W.J. 2013. Modelling the transmission of healthcare associated infections: A systematic review. *BMC Infect. Dis*. 13, 294.
- Vikram A, Lipus D, Bibby K. 2016. Metatranscriptome analysis of active microbial communities in produced water samples from the Macellus Shale. *Microb Ecol*. 72 (3):571-81.
- Vinh, D.C.; Embil, J.M. 2005. Device-related infections: A review. *J. Long Term Eff. Med. Implants*. 15, 467–488.
- Wagner J, Coupland P, Browne HP, Lawley TD, Francis SC, Parkhill J. 2016. Evaluation of PacBio sequencing for full-length bacterial 16S rRNA gene classification. *BMC Microbiol*. 16(1):274.
- Willmann, M., Bezdan, D., Zapata, L., Susak, H., Vogel, W., Schröppel, K., et al. 2015. Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular epidemiological study. *J. Antimicrob. Chemother*. 70: 1322–1330.
- Wimpenny J. 2009. Microbial metropolis. *Adv Microb Physiol*. 2009;56:29-84.
- Zannier, F., Portero, L. R., Ordoñez, O. F., Martínez, L. J., Farías, M. E., & Albarracín, V. H. 2019. Polyextremophilic Bacteria from High Altitude Andean Lakes: Arsenic Resistance Profiles and Biofilm Production. *BioMed Research International*.
- Zhang P, Chen YP, Qiu JH, Dai YZ, Feng B. 2019. Imaging the Microprocesses in Biofilm Matrices. *Trends Biotechnol*. 37(2):214-226.
- Zingg, W., Park, B.J., Storr, J., Ahmad, R., Tarrant, C., Castro-Sanchez, E., Perencevich, E., Widmer, A., Krause, et al. 2019. Technology for the prevention of antimicrobial resistance and healthcare-associated infections; 2017 Geneva IPC-Think Tank (Part 2). *Antimicrob Resist Infect Control*. 8:83.