



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN EL METRO DE LA CIUDAD DE MÉXICO MEDIANTE METAGENÓMICA Y SECUENCIACIÓN MASIVA DEL GEN DE RNAr 16S.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

CAROLINA GONZÁLEZ CEDILLO

TUTOR PRINCIPAL:

LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA
Facultad de Ciencias, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

RODOLFO GARCÍA CONTRERAS
Facultad de Medicina, UNAM

BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Abril, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

Esta tesis de Maestría se realizó en Laboratorio de Biofísicoquímica (LBF) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa (UAMC) y en el Laboratorio de Genómica Ambiental (LGA), Facultad de Ciencias (FC) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a la **Dra. Mariana Peimbert** por facilitar las instalaciones y equipo del LBF así como por su asesoría para la realización de este proyecto.

Agradezco al **M. en C. Apolinar Hernández** y la **Dra. Daniela Vargas**, miembros del LBF-UAMC, por su asesoría y apoyo para el protocolo de toma de muestras y análisis de datos.

A los entusiastas participantes del protocolo de toma de muestras: **QFB. Mario Tapia** (UNAM), **Biol. Mol. Gloria Martínez** (UAMC), **Biol. Mol. Edith Echazarreta** (UAMC), **Biol. Mol. Olin Arteaga** (UAMC), **M. en C. Carla Cicero** (UACM) y **M. en C. Fabricio Martínez** (UACM).

Agradezco al **M. en C. Cristóbal Hernández** y al **M. en C. Miguel Romero** del LGA-FC, por su valiosa asesoría en el procesamiento de datos.

Agradezco a la **Dra. Ana Luisa Bravo** (LBF-UAMC), por su valiosa ayuda en el laboratorio.

Agradezco a los miembros del comité tutor, la **Dra. Bertha González** del Instituto de Fisiología Celular y el **Dr. Rodolfo García** de la Facultad de Medicina, por sus amables e interesantes observaciones y recomendaciones.

Agradezco a la **Gerencia de Atención al Usuario del Metro** de la CDMX y a los **jefes de estación y personal en general** por las facilidades brindadas para la toma de muestras en las instalaciones.

Este trabajo fue financiado por el proyecto 47310604 Secretaría de Ciencia Tecnología e Innovación del Gobierno de la Ciudad de México convenio. SECITI/102/2017

Especialmente quiero agradecer a mis sinodales: **Dra. Gloria Soberón**, **Dra. Laura Camarena**, **Dr. Luis Servín**, **Dr. José Luis Puente** y **Dr. Lorenzo Segovia**, sus comentarios y observaciones sin duda enriquecieron nuestro trabajo, además, gracias por su paciencia. Igualmente agradezco al CONACyT por el beneficio de la beca otorgada.

A ustedes, muchas gracias.

Índice.

Agradecimientos.....	2
Abreviaturas.....	4
1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	6
2.1 La resistencia a antibióticos.....	6
2.2 Estudios de microbiomas de hospitales.....	9
2.3 Microbioma del Sistema de Transporte Colectivo (Metro) de la CDMX.....	11
2.4 Estudios en metros de otros países.....	11
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo principal.....	13
3.2 Objetivos particulares.....	13
4. Metodología.....	13
4.1 Sitios de muestreo.....	13
4.2 Toma de muestras.....	15
4.3 Bacterias cultivables.....	17
4.4 Ensayos de resistencia a antibióticos.....	18
4.5 Técnicas independientes de cultivo.....	19
4.5.2 Secuenciación tipo shotgun de bacterias cultivables de bioaerosoles.....	20
4.6 Procesamiento de los datos de secuenciación.....	21
4.6.1 Análisis de lecturas de secuenciación masiva del gen de RNAr 16S.....	21
4.7 Detección de genes de resistencia a antibióticos en los genomas de bacterias cultivables.....	22
5. Resultados.....	22
5.1 Metadatos de temperatura y humedad relativa.....	23
5.2 Crecimiento de muestras cultivables.....	23
5.3 Secuenciación masiva del gen de RNAr 16S.....	25
6. Discusión.....	41

6.1	Temperatura y humedad relativa.	41
6.2	Muestras cultivables y ensayos de resistencia a antibióticos.....	42
6.3	Secuenciación masiva del gen de RNAr 16S.	43
6.4	Secuenciación del metagenoma de cultivables de bioaerosoles e identificación de genes de resistencia a antibióticos.....	50
7.	Conclusiones.....	53
8.	Perspectivas.....	55
9.	Anexos.....	56
10.	Referencias.....	60

Abreviaturas.

HO: Referente a ambiente **H**ospitalario

NH: Referente a ambiente **No H**ospitalario

NH-1: Estación Chilpancingo

NH-2: Estación San Juan de Letrán

HO-1: Estación Hospital General

HO-2: Estación Hospital 20 de Noviembre

1. Resumen.

La identificación y estudio de los genes de resistencia a antibióticos es de suma importancia dado el aumento en la abundancia y propagación de estos, y el riesgo de salud que representan para la población. Por otra parte, el estudio de microbiomas de ambientes interiores ha tomado importancia puesto a que los humanos pasaremos un 85-90% de nuestras vidas en este tipo de espacios, por lo tanto, debemos identificar con qué tipo de microorganismos cohabitamos. Nosotros estudiamos el Sistema de Transporte Colectivo Metro de la Ciudad de México, que representa el principal medio de movilización masiva de la población capitalina. Los cerca de 4.5 millones de pasajeros que transitan diariamente por las instalaciones, intercambian, dejan y se llevan consigo principalmente bacterias. Por lo tanto, nosotros quisimos estudiar la composición taxonómica y la distribución de genes de resistencia en aire y superficie de torniquetes del Metro, con énfasis en estaciones que se encontraran cercanas a ambientes hospitalarios, para determinar si existía un aporte por parte de dichos ambientes, lo anterior, a través de técnicas tanto dependientes como independientes de cultivo. Encontramos que la mayoría de las bacterias presentes en superficie de torniquetes, están asociadas principalmente a piel de humanos. En aire encontramos que la mayoría de las bacterias se asocian regularmente a ambientes como suelo, agua y en menor proporción a humano, lo cual concuerda con un estudio previo del Metro de la CDMX, e incluso con estudios de Metros de otros países. Sin embargo, no observamos diferencias significativas entre estaciones cercanas a hospital y aquellas no asociadas a hospitales. Aparentemente la señal de bacterias y de genes de resistencia, es homogénea a través de la red del metro, y concluimos que la presencia de los hospitales, no se ve reflejada al interior del microbioma del Metro de la Ciudad, por lo tanto, no representarían un alto riesgo para la salud de los usuarios de este transporte.

2. Introducción.

2.1 La resistencia a antibióticos.

La resistencia a antibióticos se ha convertido en un serio problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en los últimos años ha alertado a la población sobre el abuso y mal uso de los antibióticos, ya que es uno de los principales factores que aumentan la propagación de su resistencia¹.

La OMS ha publicado una lista de bacterias para las cuáles ya se califica como urgente la necesidad de identificar nuevos antibióticos. En estado crítico se encuentran: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y la familia *Enterobacteriaceae*. En estado de urgencia menor: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*,¹ *Salmonellae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella spp.*²

Una manera de clasificar a los antibióticos es con base en su estructura: β -lactámicos, cloranfenicol, gluco péptidos, macrólido-lincosamida-estreptograminaB, quinolonas y sulfonamidas.

Los β -lactámicos, son aquellos que en su estructura molecular poseen un anillo β -lactámico. Su mecanismo de acción consiste en bloquear la síntesis de la pared celular por medio de la unión a unas proteínas llamadas PBPs (*penicilin-binding proteins*, por sus siglas en inglés), evitando el entrecruzamiento de los peptidoglucanos y, por ende, la transpeptidación de la pared celular. El mecanismo de resistencia más común contra estos antibióticos, es debido a unas enzimas llamadas β -lactamasas, como las de amplio espectro (ESBLs), y las de hidrólisis de carbapenémicos (carbapenemasas). Ejemplos

¹ <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> ²<https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

² <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

de este grupo de antibióticos son: penicilinas (y todos sus derivados), cefalosporinas, carbapenémicos e inhibidores de β -lactámicos. Además, en años recientes, se han identificado mutaciones puntuales en los genes de resistencia que codifican a las enzimas inactivadoras betalactamasas tales como *blaTEM-1*, *blaTEM-2* y *blaSHV-1* (Van Hoek *et al.*, 2011).

En el grupo de cloranfenicol, se encuentran aquellos antibióticos cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de proteínas por su afinidad a la enzima peptidiltransferasa de la subunidad 50S del ribosoma 70S, bloqueando así el paso de elongación. Su resistencia se da principalmente mediante la acetilación enzimática que llevan a cabo las cloranfenicol acetiltransferasas (CATs). Otro mecanismo, aunque menos frecuente, es la inactivación por fosfotransferasas, mutaciones del sitio blanco y bombas de eflujo. Algunos de los principales genes de resistencia son *cat*, *catI*, *cmr* y *cmx*. Ejemplos de estos antibióticos son: cloranfenicol, tianfenicol y azidamfenicol (Van Hoek *et al.*, 2011).

Los glucopéptidos actúan al unirse a la D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala), que es un precursor del peptidoglucano de la pared celular, inhibiendo la transglucosilación. El principal mecanismo de resistencia es la presencia de otras proteínas que sintetizan la pared usando diferentes precursores (Gardete y Tomasz, 2014; Courvalin, 2006). Ejemplos son la vancomicina, avoparcina, ristocetina y teicoplanina (Van Hoek *et al.*, 2011).

El grupo de los antibióticos macrólido-lincosamida-estreptograminaB (MLSB), a los cuales pertenece la eritromicin, tienen un mecanismo de acción que consiste en unirse a la subunidad ribosomal 50S, bloqueando la síntesis de proteínas, mientras que el mecanismo de resistencia es evitar la unión a la subunidad 50S por medio de RNAr metilasas sobre los residuos de adenina, bombas de eflujo e inactivadores como estererasas, liasas, fosforilasas y transferasas. Algunos genes que codifican proteínas con algunas de estas actividades son: *carA*, *cmr* y *ere* (Van Hoek *et al.*, 2011).

Las quinolonas inhiben la actividad de las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV, interfiriendo en el proceso de replicación de DNA. Los mecanismos de resistencia consisten en mutaciones en los genes que codifican las subunidades de dichas enzimas: *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*. En cuanto a resistencias mediadas por plásmidos, se encuentran los genes que codifican a enzimas aminoglucósido N-acetiltransferasas pertenecientes a las familias AAC(3) y AAC(6') (Poole, 2005) y la bomba de eflujo codificada por el gen *qepA*. Resulta importante resaltar que en un principio, sólo se conocía que la resistencia se codificaba por genes cromosomales, ahora se sabe que la mediada por plásmidos es igual de frecuente (Hooper y Jacoby, 2015).

En el grupo de antibióticos de las sulfonamidas cuya estructura es análoga al ácido p-aminobenzoico, el mecanismo de acción consiste en que de manera competitiva inhiben a la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), implicada en la biosíntesis del folato, necesario a su vez para la síntesis de timina. Las principales mutaciones ocurren en el gen *folP*, que codifica la enzima DHPS y es lo que ocasiona la resistencia a antibióticos como el sulfametoxazol. (Van Hoek *et al.*, 2011).

Las tetraciclinas interactúan con la membrana celular y se unen a los ribosomas impidiendo la síntesis de proteínas. Su mecanismo de resistencia es por bombas de eflujo dependientes de energía, inactivación enzimática y proteínas de protección ribosomal (RPPs). Después de las penicilinas, son las de mayor consumo a nivel mundial porque son consideradas de amplio espectro. Algunos ejemplos son: tetraciclina y oxitetraciclina (Vila-Costa *et al.*, 2017)

En cuanto a los mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden adquirir la resistencia, se pueden clasificar de la siguiente manera (MacGowan y Macnaughton, 2017):

- Conjugación (mediada por plásmidos)
- Transducción (mediada por fagos)

- Transformación (bacterias competentes capaces de adquirir DNA presente en el ambiente)
- Mutaciones (en gen o genes implicados en el mecanismo de resistencia).

Si bien hay estudios que demuestran que la resistencia a antibióticos ha estado presente en la naturaleza, en la actualidad, existen ambientes particulares donde por selección, ocurre la adquisición de mecanismos de resistencia. Estos ambientes suelen ser plantas de aguas residuales, desechos de industrias farmacéuticas, granjas y hospitales, pues hay una concentración importante de antibióticos. En dichos espacios es donde puede haber una mayor diseminación y abundancia de genes de resistencia. Dicha diseminación se lleva a cabo por una serie de elementos que en su conjunto se denominan como el mobiloma, tales como los integrones, los transposones, elementos conjugativos integrativos, así como los plásmidos y los fagos. El mobiloma propicia la transferencia horizontal de genes. En los últimos años se ha observado un incremento en el número de bacterias resistentes a antibióticos (patogénicas y no patogénicas), y quizá ese sea uno de los factores que han ocasionado el gran aumento de bacterias multirresistentes (Bengtsson-Palme, *et al.*, 2017).

2.2 Estudios de microbiomas de hospitales

Los hospitales se han convertido en uno de los principales objetos de investigación en donde convergen y se propicia un ambiente para el estudio de resistencia a antibióticos, por ello, han habido estudios como el de Gao, *et al.*, (2018), quienes caracterizaron el perfil taxonómico a partir muestras de aire (bioaerosoles) de cinco hospitales en China y cuyos resultados fueron que las bacterias con mayor abundancia en este tipo de ambientes son: *Massilia*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Methylophilus*, *Micrococcineae*, y *Corynebacterineae*. Las especies patógenas más abundantes fueron: *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium minutissimum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Arcobacter butzleri*, *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*. Otra de sus conclusiones fue que los factores que

influyen mayormente la estructura de las comunidades microbianas son la temperatura y la humedad.

Existe otro estudio de bioaerosoles en China, donde analizan las muestras de sistemas de aire acondicionado en hospitales, granjas y residencias. Entre sus principales resultados, mencionan que al menos a nivel de Phylum, no había diferencias significativas entre los organismos aislados de estos ambientes, y en todos los casos, las Proteobacterias fueron las más abundantes. Ellos utilizaron un microarreglo con 296 diferentes cebadores que están implicados en la resistencia a distintos antibióticos y determinaron que uno de los más abundantes en hospitales fue el *bla₃_cpha*, que se sabe tienen que ver con la resistencia a β -lactámicos. En granjas, encontraron mayor abundancia de genes relacionados con la resistencia a tetraciclinas, MLSB, y multidrogas. De manera general, las abundancias de genes de resistencia en granjas y hospitales fueron significativamente mayores respecto a las casas, indicando que son una fuente de dispersión de los mismos (Li *et al.*, 2019).

Otro trabajo es el de Lis *et al.*, (2009), donde por medio de un impactador, tomaron muestras de aire de casas de personal de hospitales (personal de enfermería y de medicina), para evaluar la presencia y abundancia del género *Staphylococcus* y la resistencia de estas bacterias al antibiótico meticilina, respecto a casas donde los habitantes no tuvieran que ver con ambientes hospitalarios. Sus resultados indican que existe una alta prevalencia de cepas resistentes a meticilina: *S. epidermis*, *S. hominis* y *S. cohnii* en un 40%, 40% y 60%, respectivamente, en casas del personal hospitalario, mientras que en casas de personal no relacionado con ambientes hospitalarios sólo se encontró 12% de la cepa resistente a meticilina *S. hominis*. Además, por medio de PCR, hicieron la detección del gen *mecA* (que confiere resistencia a penicilinas), el cual se halló en todas las cepas de *S. epidermis* y en algunas de *S. hominis* (50%) y *S. cohnii* (33%).

2.3 Microbioma del Sistema de Transporte Colectivo (Metro) de la CDMX.

El Metro, representa el medio de transporte más eficiente de la Ciudad de México (CDMX) y zona conurbada. Se estima que diariamente transitan alrededor de 4.5 millones de personas por sus instalaciones, con líneas y estaciones de mayor y menor afluencia (<http://www.metro.cdmx.gob.mx/>).

El estudio publicado por Hernández-Castillo *et al.*, (2014) determinó la concentración de bacterias y de hongos cultivables por medio de un impactador. La caracterización de las colonias se hizo por microscopía y pruebas bioquímicas. Se encontraron géneros de *Bacillus* y *Streptococcus*, así como los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*. Ellos demostraron que la cantidad de microorganismos correlaciona con la profundidad de los andenes. Por otra parte, se encuentra el estudio de Hernández *et al.*, (2020), que es el único estudio con técnicas independientes de cultivo, donde se tomaron muestras de superficie de pasamanos, torniquetes y tubos al interior de trenes de estaciones específicas que representan toda la red del Metro. Los datos obtenidos demuestran nuevamente que las bacterias asociadas a piel y cavidad oral son las más abundantes, mientras que los phyla más representativos son Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria. Además, el análisis de la diversidad alfa (ver **Anexo V**) tanto de los torniquetes y de pasamanos, indican que algunas de las estaciones que presentan mayor diversidad, son: Muzquiz, Chilpancingo, San Juan de Letrán y Constitución de 1917.

2.4 Estudios en metros de otros países.

Las técnicas más utilizadas para la caracterización y análisis de los microbiomas han sido dependientes de cultivo, sin embargo, solo se puede cultivar un pequeño porcentaje dado que no se satisfacen ni conocen todas las exigencias nutrimentales para cada microorganismo (Schloss y Westcott, 2011). Así pues, las técnicas de secuenciación de nueva generación, ofrecen alternativas que permiten un estudio más exhaustivo, tal es el caso del gen RNAr 16S, cuya secuencia tiene regiones tanto variables como conservadas, lo cual permite la identificación taxonómica de las bacterias. Además, la metagenómica, que es el análisis genómico de una comunidad de microorganismos a partir del DNA genómico ambiental, también permite identificar qué genes son los que se

encuentran en las secuencias de los microorganismos, permitiendo, además, el estudio metabólico (Hamdelsman, 2004).

Alrededor del mundo se han hecho diversos estudios de los transportes subterráneos, y la mayoría han sido con técnicas dependientes de cultivo. En el caso específico de bacterias, se pueden mencionar estudios en Washington, Tokio, Seúl y Oslo (Birennzvig *et al.*, 2003; Seino *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Dybwad *et al.*, 2012), mientras que para hongos, se han hecho estudios en Milán, Seúl, Tokio y Teherán (Picco y Rodolfi, 2000; Hwang *et al.*, 2010; Kawasaki *et al.*, 2010; Hoseini *et al.*, 2013). En la mayoría de estos estudios se identifican las bacterias a nivel de género, y coinciden en que la cantidad y diversidad de microorganismos principalmente se deben a la actividad antropogénica, y en menor proporción a ambientes como suelo, agua y aire.

Existen hasta el momento tres estudios que han utilizado metagenómica tipo *shotgun* para el estudio de superficies en el metro: el de Nueva York (Afshinnekoo *et al.*, 2015), el de Boston (Hsu *et al.*, 2016) y el de Hong Kong (Kang *et al.*, 2018). En el de Nueva York se asociaron los datos obtenidos con variables geoespaciales, y determinaron que el microbioma del metro refleja el microbioma de toda la ciudad. Además se centraron en el análisis de genes asociados con patogenicidad, y concluyen que si bien en este espacio puede haber presencia de dichos genes, no están representando un riesgo para la salud pública. Respecto al metro de Boston, después del análisis de diversas superficies, fue determinado que las comunidades microbianas cambian respecto al material y tipo de superficie, aunque en todos los casos dominaban las bacterias asociadas a piel y cavidad oral; también hicieron un análisis de los genes presentes e identificaron que los involucrados en resistencia y patogenicidad se encontraban en baja abundancia y del total de genes, la mayoría se encuentran en el genoma de *Cutibacterium acnes*. Recientemente se estudió el metro de Hong Kong, pero con la diferencia de que se tomaron las muestras de las palmas de manos de individuos que estuvieron en contacto previo con distintas superficies: agarraderas, tubos verticales y tubos horizontales en distintas líneas de este sistema de transporte subterráneo, en dos tiempos distintos del día (en la mañana y en la tarde). El factor más influyente en la composición de las comunidades microbianas y en la abundancia de genes de

resistencia a antibióticos y de patógenos oportunistas, fue el momento del día (Kang *et al.*, 2018).

3. Objetivos.

3.1 Objetivo principal.

Estudio de la genómica ambiental de los microorganismos presentes en el aire (bioaerosol) y en la superficie de torniquetes de cuatro estaciones del Metro de la CDMX con énfasis en la identificación de genes de resistencia a antibióticos, mediante el uso de técnicas independientes y dependientes de cultivo.

3.2 Objetivos particulares

- a)** Comparar la diversidad taxonómica de microorganismos presentes en el aire de áreas de andenes y de exteriores, así como de superficie de torniquetes de las estaciones Hospital 20 de Noviembre, Hospital General, San Juan de Letrán y Chilpancingo.
- b)** Cuantificar la proporción de bacterias resistentes a diferentes antibióticos mediante cultivo.
- c)** Identificar y cuantificar los genes de resistencia a antibióticos en las muestras de aire de estaciones cercanas a hospitales y compararlos con las muestras de aire de estaciones no cercanas a hospitales.

4. Metodología.

4.1 Sitios de muestreo.

La toma de muestras se llevó a cabo en cuatro estaciones de Metro. Dos estaciones cercanas a ambientes hospitalarios: Hospital General (HO-1) y Hospital 20 de Noviembre (HO-2), y dos que no se encuentran cercanas a ambientes hospitalarios: Chilpancingo

(NH-1) y San Juan de Letrán (NH-2). Se hizo en las áreas de andén, de torniquetes y los espacios aledaños de entrada/salida de cada estación (**Figura 1**). Las características de las estaciones, de acuerdo con el sitio oficial de internet del metro, (<http://www.metro.cdmx.gob.mx/>), son las siguientes:

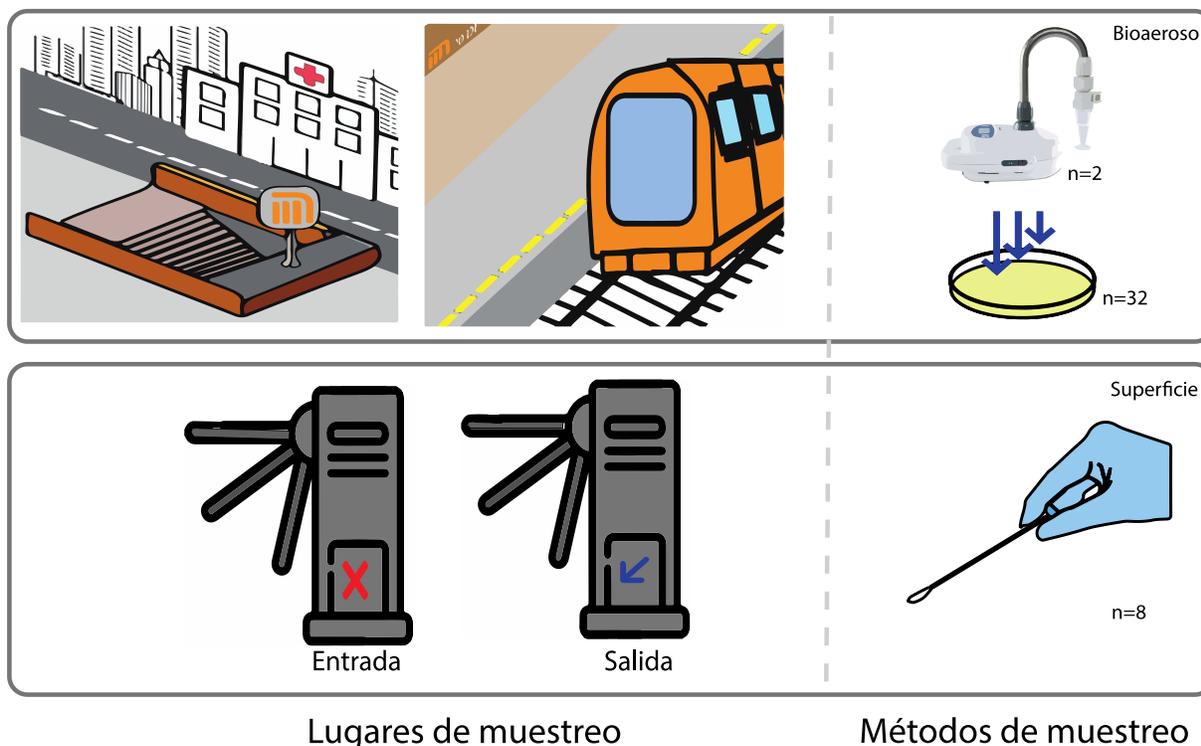


Figura 1. Lugares de muestreo y tipo de método que se utilizó. El panel superior indica que en el área de entrada/salida de la estación del metro, y en el área de andén, se tomaron muestras con el aspirador Coriolis μ Biological Air-Sampler®, y se expusieron cajas (método gravitacional). Además, se tomaron muestras de superficie de torniquetes de entrada y salida con un hisopo (Copan®). Lo anterior aplica para cada una de las cuatro estaciones muestreadas.

- HO-1 (Hospital General): pertenece a la Línea 3, sin correspondencia, con localización en la Alcaldía Cuauhtémoc, es considerada de baja afluencia en comparación con las demás estaciones de la misma línea. Tiene la peculiaridad de estar contigua a las inmediaciones del Hospital General, que brinda atención pública de especialidades médicas.

- HO-2 (Hospital 20 de Noviembre): estación que pertenece a la Línea 12, no tiene correspondencia y se localiza en la Alcaldía Benito Juárez. Es de las estaciones de mediana afluencia de dicha línea. Tiene la característica de estar contigua a las inmediaciones del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, del ISSSTE.
- NH-1 (Chilpancingo): estación perteneciente a la Línea 9, sin correspondencia con otras estaciones del Metro, localizada igualmente en la Alcaldía Cuauhtémoc. Es la tercera estación de mayor afluencia de dicha línea. Además, intersecta con otro medio de transporte: la Línea 1 del MetroBús.
- NH-2 (San Juan de Letrán): es una estación que pertenece a la Línea 8, no tiene correspondencia y se encuentra localizada en el centro de la CDMX, en la Alcaldía Cuauhtémoc. De acuerdo con las cifras de operación del 2019, es la segunda estación de mayor afluencia de esa línea.

La decisión de elegir en particular estas cuatro estaciones, se debe al objetivo principal de este trabajo: el de determinar si existen diferencias en estaciones debido a la cercanía con hospitales, lo cual es el caso particular de Hospital General y 20 de Noviembre, mientras que las estaciones de referencia, son San Juan de Letrán y Chilpancingo. Las estaciones de referencia fueron seleccionadas por su alta diversidad (índice de Shannon de 7.40 y 7.48, respectivamente) de acuerdo con el trabajo de Hernández *et al.*, (2019).

4.2 Toma de muestras.

La toma de muestras se realizó los días 24 y 25 de octubre del 2018 en un horario de 9:30-14:00 h y se hizo de manera simultánea tanto en el interior como en el exterior de cada estación. Adicionalmente, se tomaron los datos de temperatura y de humedad relativa.

4.2.1. Muestras de aire.

Se tomaron 6 muestras de aire de cada estación (3 de interior y 3 de exterior) con el aspirador de bioaerosoles *Coriolis μ Biological Air-Sampler*[®] (Bertin Instruments). El aspirador se colocó sobre una escalera (1m de altura) en la parte media del andén (muestra de interior), y en una de las entradas de la estación (muestra de exterior) (ver **Anexo I**). Se muestreó un volumen final de 3m³ para cada una de las muestras de aire durante 15 min a una velocidad de 200 L/min (cada muestra: 3000L= 3m³) con el medio de recolección STE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 100 mM; pH 8.0). Las muestras se mantuvieron y transportaron hasta el laboratorio a una temperatura de 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 5 min y los botones obtenidos se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento. Adicionalmente, se expusieron 16 placas de Petri con medio LB (Sigma[®]) durante 30 minutos. El método gravitacional permitió el crecimiento de bacterias cultivables. Se usó como control negativo cajas de Petri que no fueron expuestas. Las cajas se incubaron a 28°C durante 48h.

4.2.2 Muestras de superficie de torniquetes.

Se tomaron muestras de superficie de 8 torniquetes de cada estación (4 de entrada y 4 de salida). Las muestras se recolectaron con hisopos de nylon (Copan[®]) humedecidos con medio STE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 100 mM; pH 8.0). El área final de hisopado por cada torniquete fue de 600 cm². Las muestras se transportaron a 4°C hasta el laboratorio donde se homogenizaron mediante agitación en vórtex por ~10 segundos. Las muestras se dividieron en dos: 90 μ L se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo LB (n=3, 30uL por caja). Las cajas se incubaron a 28°C durante 48h. La muestra restante se almacenó junto con el hisopo a -80°C hasta su extracción. En la **tabla 1** se resumen el tipo y número de muestras que se tomaron.

Tabla 1. Datos específicos de las muestras tomadas en cada estación en función del ambiente cercano a la estación.

Ambiente	Estación	Aire (n) independiente cultivo	Aire (n) dependientes cultivo (cajas Petri)	Superficie (n) independientes cultivo	Superficie (n) dependientes cultivo (cajas Petri)
No-Hospitalario	NH-1	3 interior	16 interior	4 entrada	3
		3 exterior	16 exterior	4 salida	
	NH-2	3 interior	16 interior	4 entrada	3
		3 exterior	16 exterior	4 salida	
Hospitalario	HO-1	3 interior	16 interior	4 entrada	3
		3 exterior	16 exterior	4 salida	
	HO-2	3 interior	16 interior	4 entrada	3
		3 exterior	16 exterior	4 salida	
Total:		24	128	32	12

4.3 Bacterias cultivables.

Transcurridas las 48h de incubación, se hizo el conteo de las Unidades Formadoras de Colonia (UFCs) de las 128 cajas expuestas. Posteriormente, se aislaron grupos de 300 UFCs de cada muestra. Las colonias se seleccionaron con base en la observación de las características morfológicas de color, tamaño, consistencia y aspecto superficial. Después de su crecimiento a 28°C, estos grupos se recuperaron y resuspendieron en medio líquido LB para su almacenamiento y posterior procesamiento (**Figura 2**).

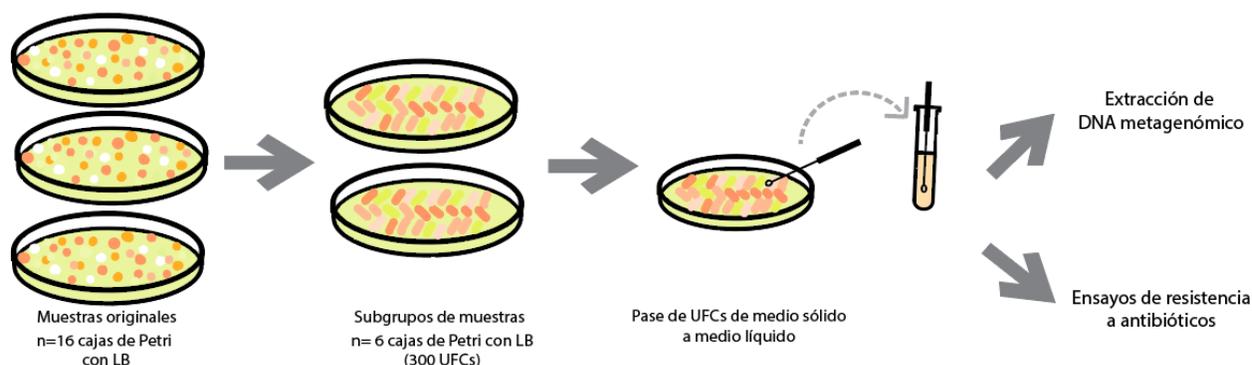


Figura 2. Procesamiento y almacenamiento de UFCs de bioaerosoles. Se aislaron 300 UFCs de cada condición. Las colonias se recuperaron en medio líquido, de donde se hizo la extracción directa de DNA metagenómico y los ensayos de resistencia a antibióticos.

4.4 Ensayos de resistencia a antibióticos.

Para los ensayos de resistencia antibióticos, las muestras preservadas en medio líquido LB de los grupos de cultivables de bioaerosoles y superficie de torniquetes de las cuatro estaciones, se juntaron en cuatro lotes que se describen a continuación:

- a. Las UFCs de bioaerosol de interior y de exterior de HO-1 y HO-2.
- b. Las UFCs de bioaerosol de interior y exterior de NH-1 y NH-2.
- c. Las UFCs de superficie de torniquetes de entrada y salida de HO-1 y HO-2.
- d. Las UFCs de superficie de torniquetes de entrada y salida de NH-1 y NH-2.

Los lotes se juntaron con base en la medición de la densidad óptica por espectrofotometría para que se tuviera una concentración de 1×10^9 . Y se hicieron diluciones en serie para tener una concentración final de 2×10^3 bacterias (80 μ L de inóculo, n=3) en cada caja con medio LB y LB adicionado con los antibióticos (**Figura 3**): ampicilina (100 μ g/mL), tetraciclina (10 μ g/mL), eritromicina (10 μ g/mL), neomicina (10 μ g/mL), cefotaxima (5 μ g/mL), meropenem (5 μ g/mL) y ciprofloxacina (5 μ g/mL). Las cajas sembradas se incubaron a 28°C por 48h. Posteriormente, se hizo el conteo de las placas con LB sin antibiótico porque se utilizaron como control para determinar el porcentaje de resistencia antimicrobiana de las UFCs, así que se tomaron como el 100%, y después se hizo la relación del crecimiento con las placas adicionadas con antibióticos.

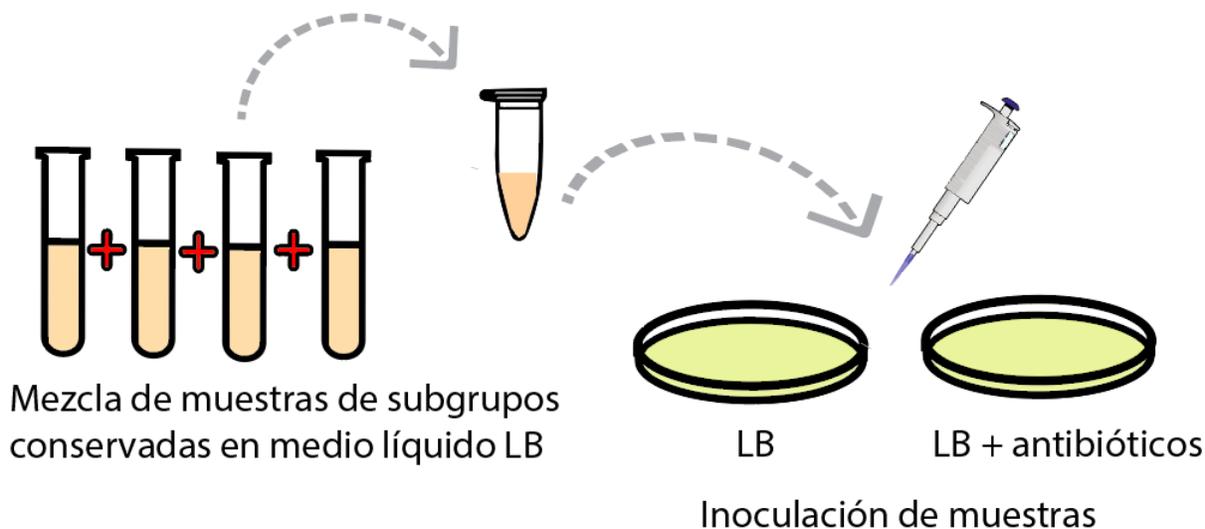


Figura 3. Diagrama de flujo de los ensayos de resistencia a antibióticos. Después de que se mezclaran equivalentemente las muestras los subgrupos, se inocularon placas sin y con antibióticos.

4.5 Técnicas independientes de cultivo.

4.5.1 Secuenciación masiva del gen de RNAr 16S.

4.5.1.1 Extracción de DNA y PCR.

La extracción de DNA de las muestras independientes de cultivo (32 de superficie de torniquetes y 24 de bioaerosoles), se llevó a cabo con el kit PowerSoil (Mobio®) siguiendo el protocolo del fabricante, con la única diferencia de que en el primer paso, además de añadir la solución C1, también se adicionó fenol:cloroformo (1:1). Los 32 DNAs de superficie de torniquete se mantuvieron por separado, sin embargo, los triplicados de las muestras de bioaerosoles, se juntaron con el objetivo de tener mayor concentración de DNA, por ello, al final se obtuvieron 8 muestras de bioaerosoles. Se hizo la cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría UV. Para evaluar la integridad y viabilidad de los DNAs metagenómicos. se realizó una PCR del gen de RNAr 16S con el par de primers 27F/1492R (5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3'/5'-CGTTACCTTGTTACGACTT-3').

4.5.1.2 Bibliotecas de secuenciación masiva.

Las 40 bibliotecas se prepararon mediante una PCR con el par de oligonucleótidos MiSeq341F/MiSeq805R(5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTAGGNGGCWG CAG3'/5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC3'), que incluyen los adaptadores para la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq®. Dichos oligonucleótidos amplifican las regiones V3 y V4 del gen de RNAr 16S, y generan un producto de secuenciación de 464 pb. Se realizaron triplicados de las bibliotecas para cada una de las 40 muestras (32 de superficie de torniquetes y 8 de bioaerosoles de interiores y exteriores). Cada reacción consistió en 4µL de amortiguador (5x), 1.6µL de dNTPs (2.5mM), 1µL de oligonucleótidos MiSeq341F (5pmol/µL), 1µL de oligonucleótidos MiSeq805R (5pmol/µL), 0.2µL de polimerasa Q5 HotStart (New England Biolabs™), 1µL de la muestra de DNA genómico correspondiente y agua c.b.p 20 µL de volumen final de reacción. Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 180s, desnaturalización a 92°C por 40s, alineamiento a 58°C por 40s, extensión a 72°C durante 90s, durante 30 ciclos y una extensión final de 5min a 72°C. Luego con una electroforesis horizontal en gel de agarosa, se identificó la presencia o ausencia de dicha amplificación. Posteriormente, se cuantificaron los amplicones mediante espectrofotometría con el equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific®, USA) a una longitud de onda de 260 nm.

La secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio de Servicios Genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, Unidad Irapuato), utilizando la plataforma de Illumina® Miseq 2x300.

4.5.2 Secuenciación tipo shotgun de bacterias cultivables de bioaerosoles.

Los dos lotes de muestras de bioaerosoles de bacterias cultivables de hospital y no-hospital, se procesaron para hacer la extracción de DNA genómico (ver 5.5.1.1) de 1200 UFCs de cada uno.

La preparación de las bibliotecas Truseq 2x150 y la secuenciación tipo *shotgun* se llevó a cabo también por el Laboratorio de LANGEBIO, Irapuato.

4.6 Procesamiento de los datos de secuenciación.

4.6.1 Análisis de lecturas de secuenciación masiva del gen de RNAr 16S.

Se analizó la calidad de las lecturas con el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). El proceso de ensamblado se hizo con Casper (Kwon, Lee, y Yoon, 2014) con los parámetros por defecto, luego, se formaron Unidades Taxonómicas Operativas (OTUS) con CD-HIT-EST (W. Li y Godzik, 2006) mediante la agrupación de las secuencias al 97% de identidad. Se seleccionaron las secuencias representativas de cada OTU con el código *pick_rep_set.py* de QIIME (Caporaso *et al.*, 2010). Se hizo la asignación taxonómica de las secuencias representativas utilizando BLAST con la base de datos de Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006). Se removieron las secuencias de aparición única (*singletons*), mitocondriales y de cloroplasto, además, se identificaron las quimeras con *parallel_identify_chimeric_seqs.py* de QIIME (Caporaso *et al.*, 2010). Los gráficos y análisis se llevaron a cabo en R con las paqueterías *vegan* (Oksanen *et al.*, 2007), *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013) y *ggplot2* (Wickham, 2011)

4.6.2. Análisis de secuencias de genomas de bacterias cultivables de bioaerosoles.

Las lecturas de los dos metagenomas de bacterias cultivables (lote hospital y lote no-hospital) se filtraron por calidad con Trimmomatic (Bolger, Lohse, y Usadel, 2014) y se unieron los extremos pareados, luego, se hizo un primer ensamblado con metaSPAdes (Nurk, Meleshko, Korobeynikov y Pevzner, 2017). Todas las lecturas crudas se alinearon contra los *contigs* de metaSPAdes utilizando *bbwrap* (Bushnell, 2015), y las lecturas que no se pudieron alinear, se extrajeron para hacer un segundo ensamble con Velvet (Zerbino y Birney, 2008). Los *contigs* resultantes de ambos ensambladores, se juntaron y se hizo un segundo alineamiento de los *contigs* con todas las secuencias crudas, se extrajeron las no alineadas y se sumaron a los *contigs*, lo anterior, con el objetivo de conservar la mayor información posible. Se hizo un filtrado por longitud de secuencias

mayores a 149 nucleótidos. Con los *contigs* y secuencias filtradas se hizo la predicción de los marcos de lectura abiertos con Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010), esto permitió determinar el número de proteínas en ambos metagenomas. Por otra parte, los *contigs* y secuencias filtradas se subieron a la plataforma de MG-RAST para obtener los perfiles de funciones metabólicas.

La asignación taxonómica se llevó a cabo con los marcos de lectura abiertos con Kraken (Wood y Salzberg, 2014) y la base de datos de RefSeq (Pruitt, Tatusova y Maglott, 2007).

4.7 Detección de genes de resistencia a antibióticos en los genomas de bacterias cultivables.

Las proteínas predichas se utilizaron para hacer la identificación de genes implicados en mecanismos de resistencia. Para esto, se utilizó el programa BLASTp (versión 2.6.0+) (Camacho *et al.*, 2009) y la base de datos de CARD, diciembre 2019 (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (McArthur *et al.*, 2013). Los resultados se filtraron mediante los parámetros de *e-value* menor a 1×10^{-5} , cobertura mayor al 60%. El mejor *hit* se determinó por su *bitscore*. La frecuencia relativa de cada gen se normalizó con el número de proteínas predichas.

5. Resultados

Los días 24 y 25 de octubre de 2018, se tomaron muestras en cuatro estaciones del metro de la Ciudad de México: Hospital General (HO-1) y 20 de Noviembre (HO-2), como referentes de estaciones que son cercanas a ambientes hospitalarios, y Chilpancingo (NH-1) y San Juan de Letrán (NH-2), como referentes de estaciones no cercanas a ambientes hospitalarios. Las muestras correspondieron a bioaerosoles, en el área de andenes y área aledaña de la entrada/salida de las estaciones, y de hisopados de superficie de 8 torniquetes, 4 de entrada y 4 de salida.

5.1 Metadatos de temperatura y humedad relativa.

Simultáneamente a la toma de muestras, se registraron los datos de temperatura (°C) y humedad relativa (%), para poder determinar si existía alguna correlación entre dichos parámetros y los resultados de secuenciación en cada sitio muestreado: el área inmediata exterior de la estación, el área de torniquetes y el área de andenes. En la **tabla 2** se muestran la media y desviación estándar de cada estación.

Tabla 2. Cifras de los metadatos de temperatura (T) y humedad relativa (HR) de cada estación y lugar de muestreo (media ± desviación estándar).

Sitio de muestreo	Estación							
	HO-1		HO-2		NH-1		NH-2	
	T (°C)	%HR	T (°C)	%HR	T (°C)	%HR	T (°C)	%HR
Andén	25.7±1.9	39.2±3.4	22.5±1.0	50.2±1.9	24.5±2.4	51.25±7.4	23.5±0.6	43.0±1.9
Área de torniquetes	26.5±0.5	34.2±0.9	23.7±0.5	42.7±2.6	24.2±0.5	46.0±1.4	23.2±1.0	42.2±1.2
Exterior de estación	22.5±1.0	37.5±2.0	24.2±0.5	42.2±1.9	18.2±0.5	58.25±2.9	17.0±0.6	54.0±0.7

En el caso de tres estaciones (HO-1, NH-1 y NH-2), se registraron temperaturas mayores al interior de las estaciones, tanto en las áreas de andén, así como en las áreas de torniquetes. En la estación HO-2, la temperatura fue mayor al exterior de la estación. Las lecturas de humedad relativa fueron menores en la estación HO-1 y mayores en las estaciones HO-2 y NH-1.

5.2 Crecimiento de muestras cultivables.

Las muestras de bioaerosoles obtenidas a partir de la exposición de 16 placas en el interior y 16 placas en el exterior en cada una de las cuatro estaciones, y de la inoculación de las muestras de superficie de torniquetes, mostraron el crecimiento de UFCs después de incubarlas 48h a 28°C. En la **figura 4** se muestra un ejemplo del tipo de crecimiento que se observó en las 140 placas de Petri.

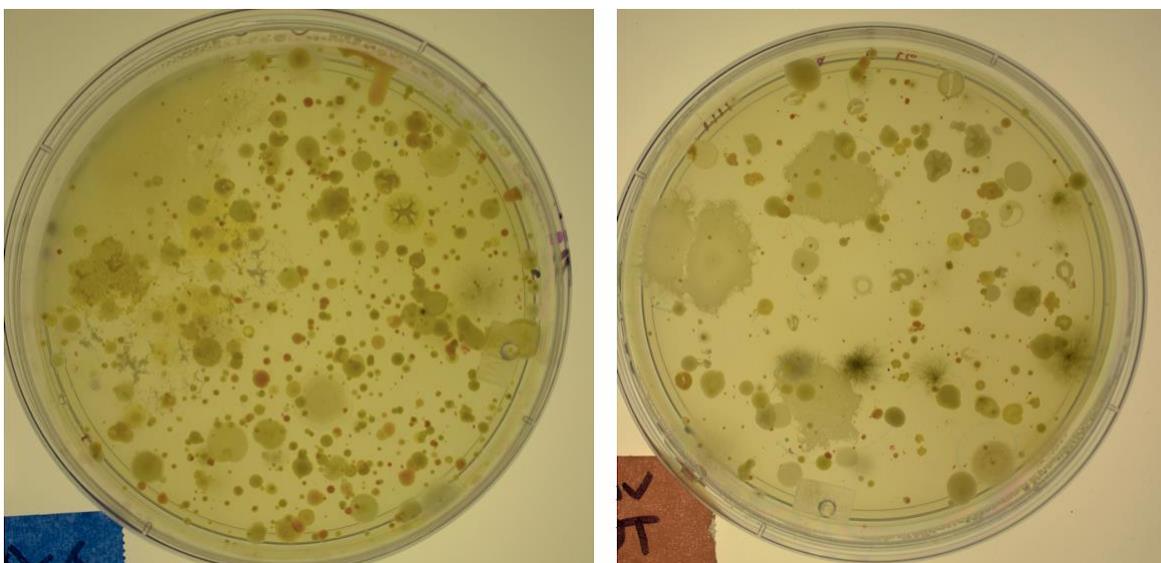


Figura 4. Crecimiento en cajas de Petri. Crecimiento de UFCs en la estación NH-2 del interior (derecha) y exterior (izquierda).

En la **tabla 3**, se resumen las medias de UFCs que se obtuvieron en cada condición de crecimiento. De manera general, se obtuvo mayor número de UFCs en las muestras de bioaerosoles, y específicamente en el exterior.

Tabla 3. Crecimiento de UFCs de cada condición, se muestran los datos de media y total.

HO-1			HO-2			NH-1			NH-2		
Interior	Exterior	Superf.									
25±8	67±7	16±3	6±3	70±1	27±12	26±8	106±30	12± 4	61±9	155±20	27± 5
Total:	Total:	Total:									
409	1075	309	98	1115	68	417	1697	36	981	2484	71

Para las pruebas de resistencia, se eligieron y utilizaron antibióticos con distintos mecanismos de resistencia. Las muestras cultivables se agruparon en cuatro distintas condiciones: bioaerosol y superficie, ya sean de estaciones cercanas a hospital o de estaciones no cercanas a hospital. Las bacterias cultivables se crecieron en cajas de Petri en presencia de 9 antibióticos. Se utilizó un inóculo líquido de 1200 UFCs para cada condición (ver *sección 4.4* en metodología). En la **figura 5** se muestran los diagramas de caja para cada uno de los antibióticos. Los porcentajes mayores de resistencia se observaron con los antibióticos neomicina (19%) y eritromicina (17%), mientras que los porcentajes menores se registraron con tetraciclina (0.7%) y ciprofloxacina (2.5%). A simple vista se observan diferencias entre las diferentes condiciones (hospital / no

hospital), sin embargo, ninguna muestra fue estadísticamente significativa ($p > 0.01$) de acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis.

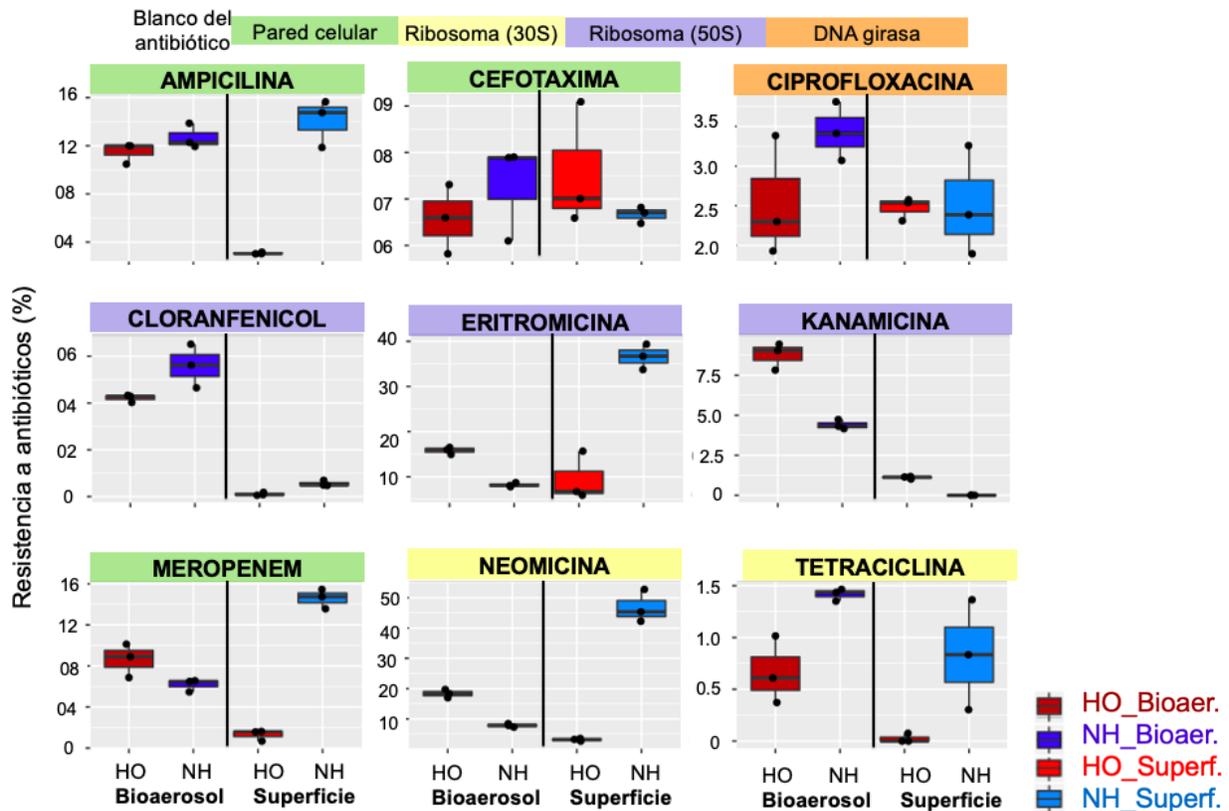


Figura 5. Porcentajes de resistencia a antibióticos de muestras cultivables. Para cada antibiótico se indican los datos para bioaerosol (lado izquierdo), y los datos de superficie (lado derecho) de las dos condiciones hospital (HO) y no-hospital (NH) resaltados con colores rojos y azules, respectivamente.

5.3 Secuenciación masiva del gen de RNAr 16S.

6.3.1. Extracción de DNA y obtención de bibliotecas.

Las 40 muestras que se tomaron de bioaerosoles ($n=8$) y de superficie de torniquetes ($n=32$), se procesaron para obtener DNA metagenómico, la media de concentración de DNA para las muestras de superficie fue de 7.0 ± 3.7 ng/uL, mientras que para las muestras de bioaerosol, fue de 11.5 ± 6.0 ng/uL (ver **Anexo II**). A partir de estas muestras, se prepararon las bibliotecas del gen de RNAr 16S para secuenciación Illumina-MiSeq 2x300, con el par de oligonucleótidos MiSeq341F/MiSeq805R (ver **Anexo III**).

6.3.2 Procesamiento de lecturas de secuenciación.

Las secuencias se parearon y se agruparon al 97% de identidad para conformar Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs), posteriormente, se eliminaron las secuencias de aparición única (*singletons*) y las secuencias de cloroplastos y mitocondrias. Finalmente, el análisis se hizo con un total de 41,827 OTUs (**tabla 4**), de los cuales, 12,177 OTUs aparecen en muestras de bioaerosol y 39,458 a OTUs en superficie de torniquetes.

Tabla 4. Datos generales de las lecturas de secuenciación masiva del gen de RNAr 16S.

	Secuencias	Secuencias pareadas	# OTUs (97%)	# OTUs (97%) sin <i>singletons</i>	OTUs (97%) sin cloroplastos y mitocondrias
40 muestras	5, 082, 478 (3.16x10 ⁹ b)	2, 541, 239	362, 816	43, 519	41, 827
Promedio por muestra	64, 003 ± 10581	63, 530 (99.26 %) ± 10525	12, 273 ± 2980	4, 102 ± 1451	4, 087 ± 1342

6.3.3 Diversidad alfa.

Se calculó la diversidad entre muestras con distintos estimadores (**Anexo V**). En la **figura 6** se observa que la diversidad es mayor en las muestras de superficie respecto a las de bioaerosol, con $H'=6$ y $H'=5.5$, respectivamente. Este mismo comportamiento se observa aún separando las muestras por ambiente hospitalario y no-hospitalario, como se muestra en la **figura 7**, con los valores de Shannon de $H'=5.5$, $H'=5.6$ para bioaerosol y $H'=5.9$ y $H'=6$ para superficie, para hospital y no-hospital, respectivamente. La diversidad de ambientes no-hospitalarios tanto de bioaerosol como de superficie, es mayor que las de las muestras de ambiente hospitalario.

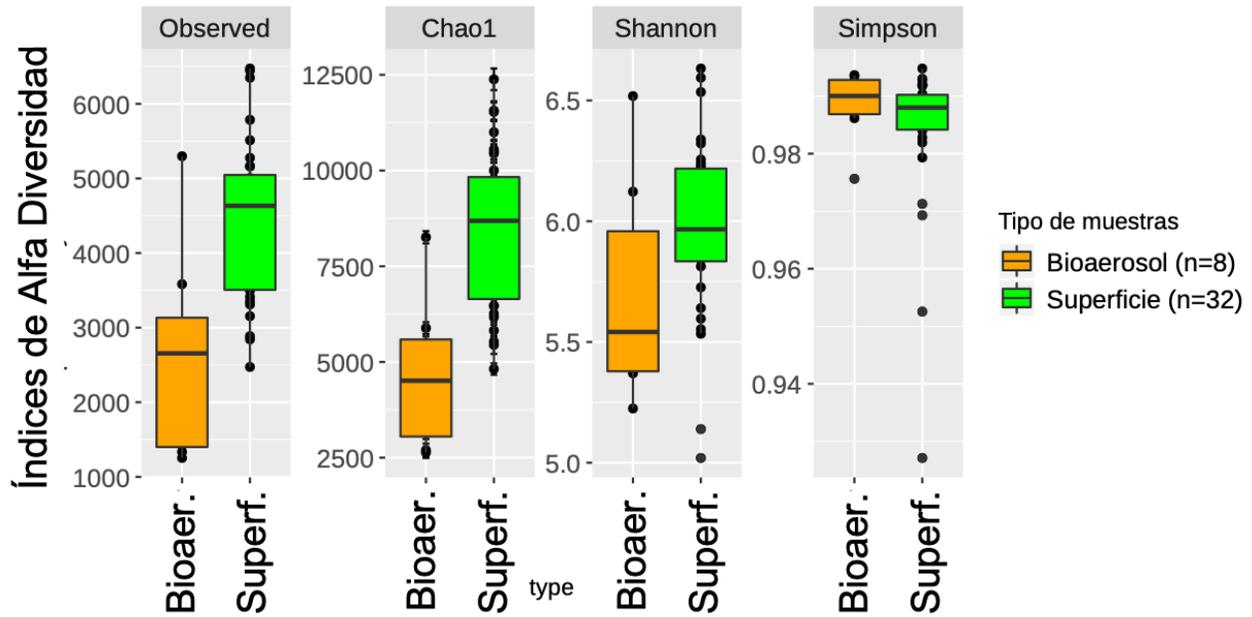


Figura 6. Gráficos de cajas de índices de diversidad alfa entre tipo de muestras. Las gráficas resaltadas en amarillo corresponden a las muestras de bioaerosoles (n=8) y las verdes a las muestras de superficie de torniquetes (n=32).

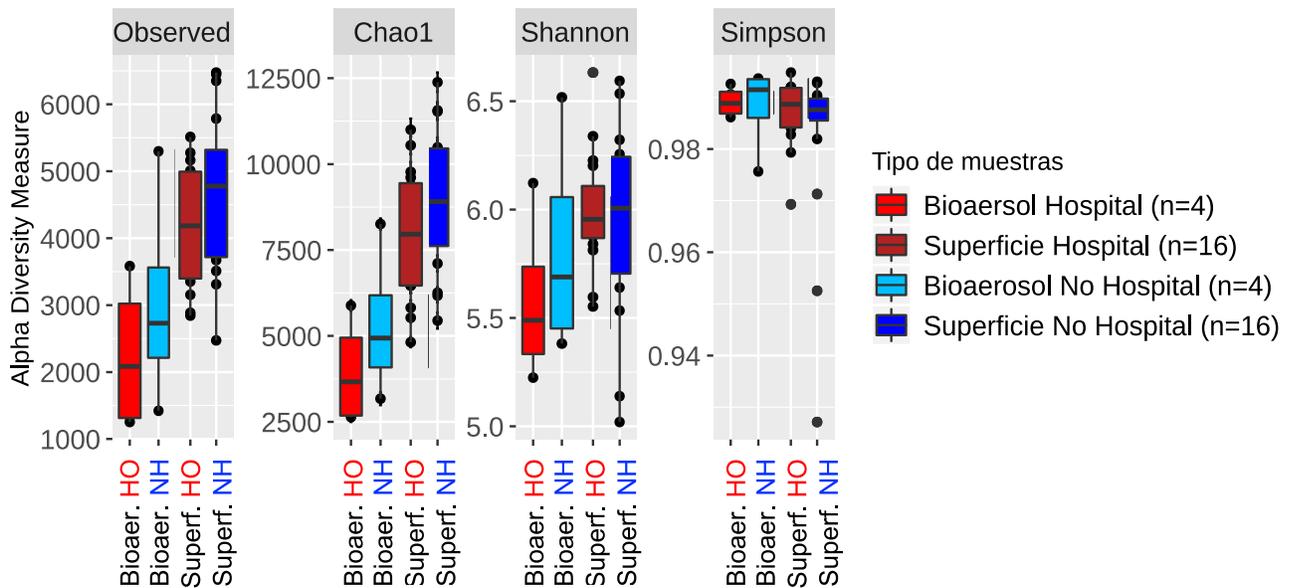


Figura 7. Gráficos de cajas de índices de diversidad alfa entre tipo de muestras y ambiente. Las gráficas resaltadas en tonos de rojo pertenecen a ambientes hospitalarios y las de tonos en azul, a ambientes no hospitalarios.

2.3.4 Diversidad beta.

Se hicieron las comparaciones con diferentes métodos y distancias para determinar la diversidad beta. En la **figura 8**, se muestran los gráficos del análisis multivariado NMDS, calculados con Bray-Curtis. Se observa que, independientemente de si se toma en cuenta la abundancia relativa (*weighted*) o sólo presencia o ausencia (*unweighted*), las muestras principalmente se agrupan con base en el lugar de toma de muestra, es decir, bioaerosol y superficie), no se agrupan entre ambientes de hospital y no-hospital.

También se evaluó si las condiciones de temperatura o humedad influían en el comportamiento de agrupamiento de las muestras, sin embargo, en ningún caso se observó algún tipo de correlación.

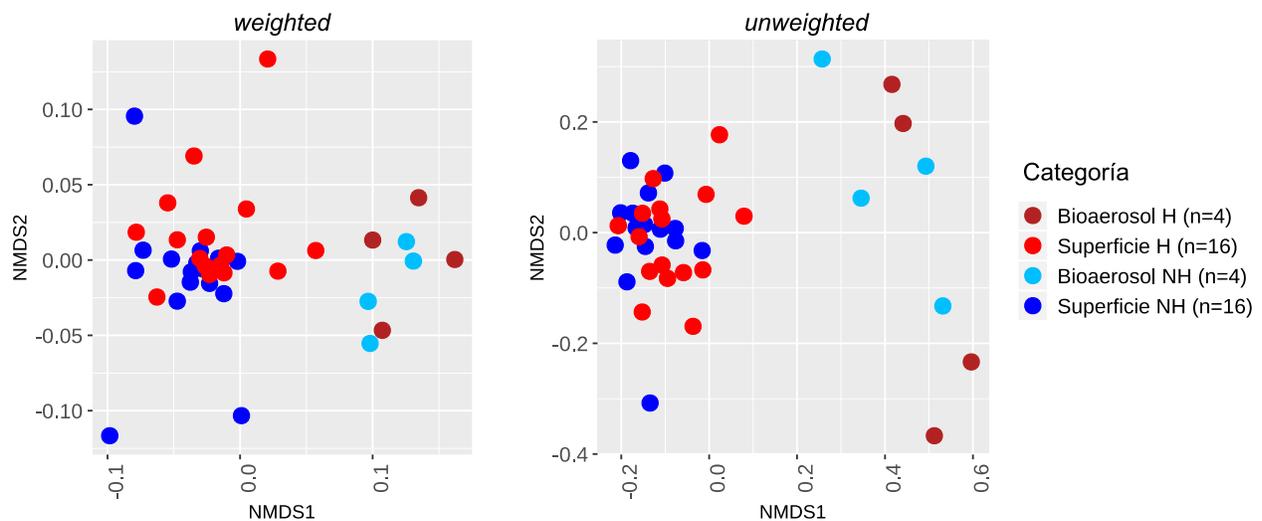


Figura 8. Ordenamientos de diversidad beta entre tipo de muestras y ambiente. Se calcularon con la distancia Bray. Los tonos rojos indican que son muestras de hospital y los tonos de azul que son de muestras de no hospital. Los ordenamientos se hicieron con los parámetros tanto de *weighted* como *unweighted*.

2.3.5 Composición del microbioma.

Las secuencias se agruparon con un valor de corte de 97% de identidad y de dichas secuencias se obtuvieron 41,827 OTUs, de los cuales se hizo la asignación taxonómica.

Los phyla más abundantes tanto en bioaerosol como superficie, son Actinobacteria y Proteobacteria. La principal diferencia es en el Phylum Firmicutes, ya que se nota que hay menor abundancia en las muestras de bioaerosol que en las de superficie (**figura 9**). Las clases más abundantes son: Actinobacteria, Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria, y se observa una menor abundancia en las muestras de bioaerosol respecto a las de superficie en la clase Deinococci. A nivel de orden, los más abundantes son Actinomycetales, Rhodobacterales y hay una abundancia menor de Pseudomonadales y Lactobacillales en las muestras de bioaerosol. Respecto al nivel de familia, las más abundantes son Staphylococcaceae, Moraxellaceae y una abundancia menor de Microcococcaceae en las muestras de bioaerosol.

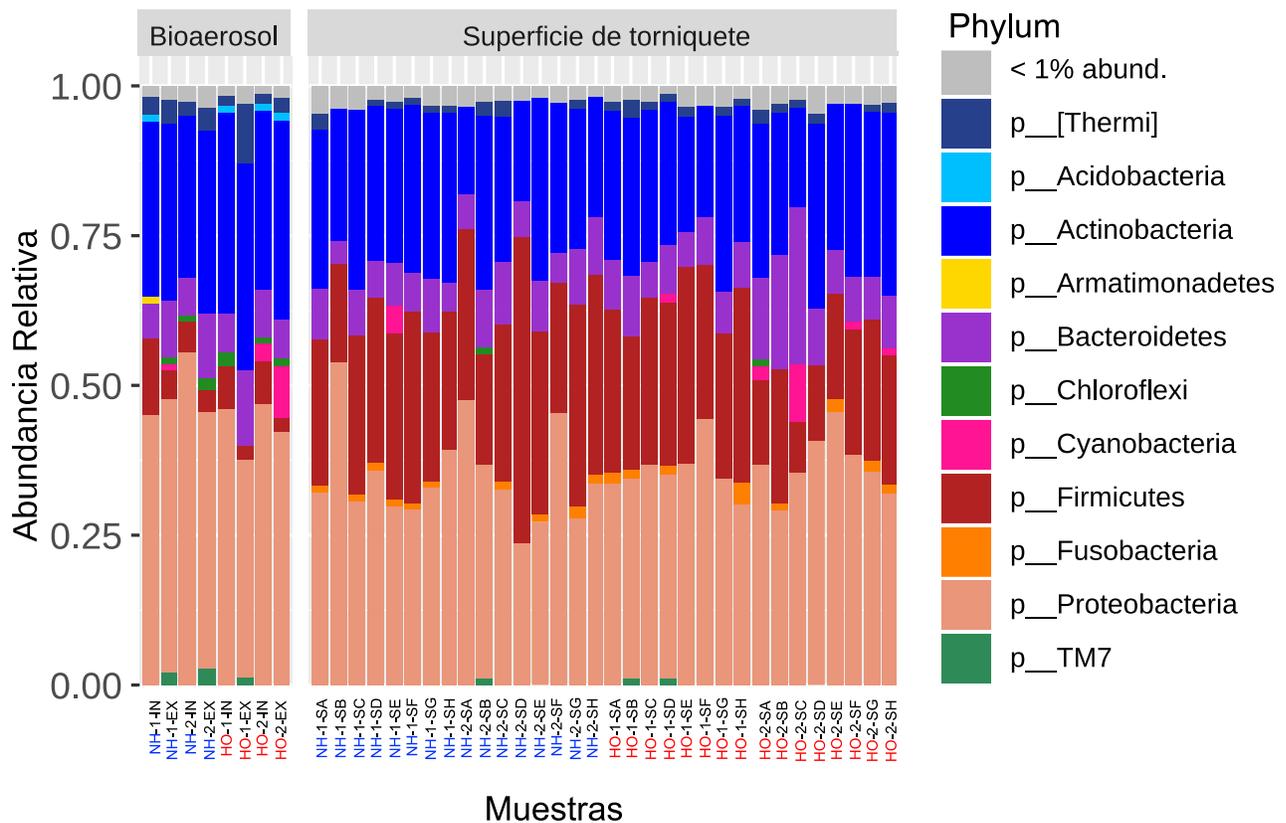


Figura 9. Gráficos de barras de Phylum. Las muestras resaltadas en azul corresponden a ambientes no hospitalarios y las resaltadas en rojo a hospitalarios. IN=Interior; EX=Exterior; S=Superficie de torniquetes. Las letras A-D, corresponden a torniquetes de entrada, mientras que de E-H, a torniquetes de salida.

Para determinar a nivel de género cuáles fueron los más abundantes, se colapsaron las 8 muestras de bioaerosol y las 32 de superficie (**figura 10**). Los géneros más abundantes

en bioaerosol son *Kocuria*, *Paracoccus* y *Deinococcus*, respecto a superficie, son *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Cutibacterium*, *Corynebacterium* y *Acinetobacter*.

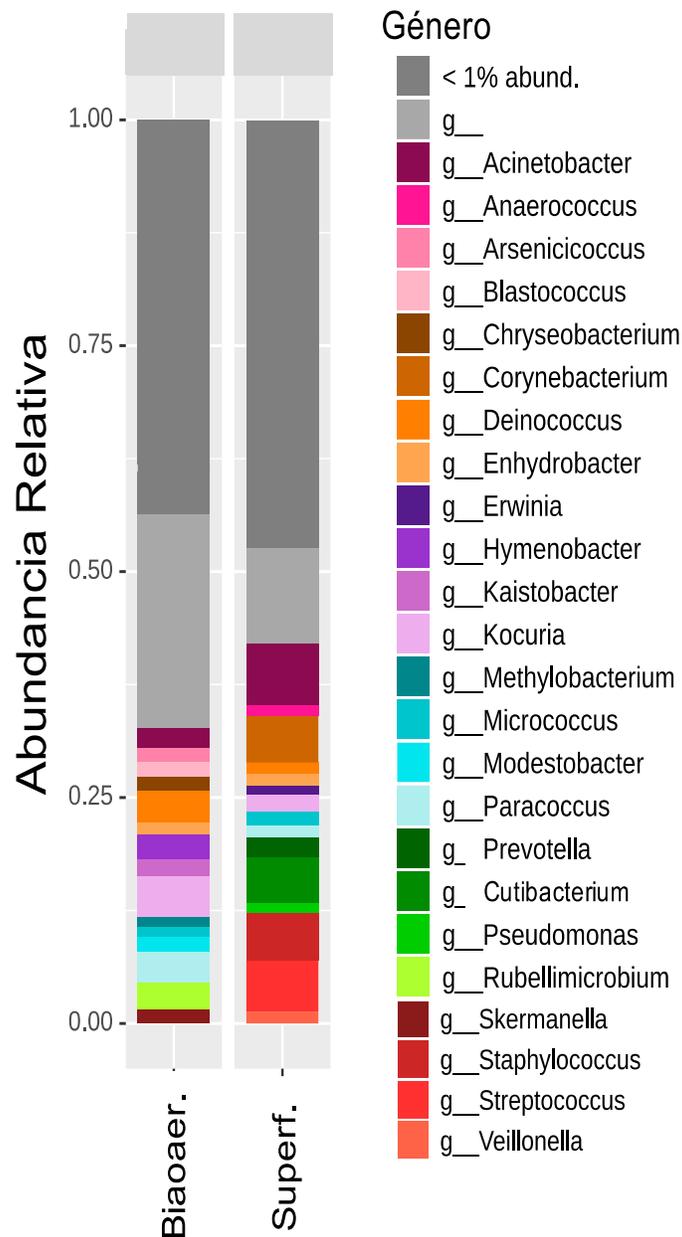


Figura 10. Taxonomía de géneros de las muestras de bioaerosol y de superficie de torniquetes. Las ocho muestras de bioaerosol se colapsaron en una sola barra, al igual que las 32 de superficie.

La frecuencia de los géneros se desglosa de acuerdo con el tipo de ambiente, hospitalario y no hospitalario en la **Figura 11**. En las muestras de bioaerosol de hospital

se observa una mayor abundancia relativa de los géneros *Arsenicococcus* y *Polaromonas*, mientras que en el bioaerosol de no-hospitalario *Micrococcus* es más abundante. En las muestras de superficie de torniquetes de estaciones cercanas a hospital, hay mayor abundancia de *Bacillus*, *Hymenobacter*, *Myroides* y *Rubellimicrobium*, y en las superficies de torniquetes de no-hospitalario, de *Anaerococcus* y *Leuconostoc*.

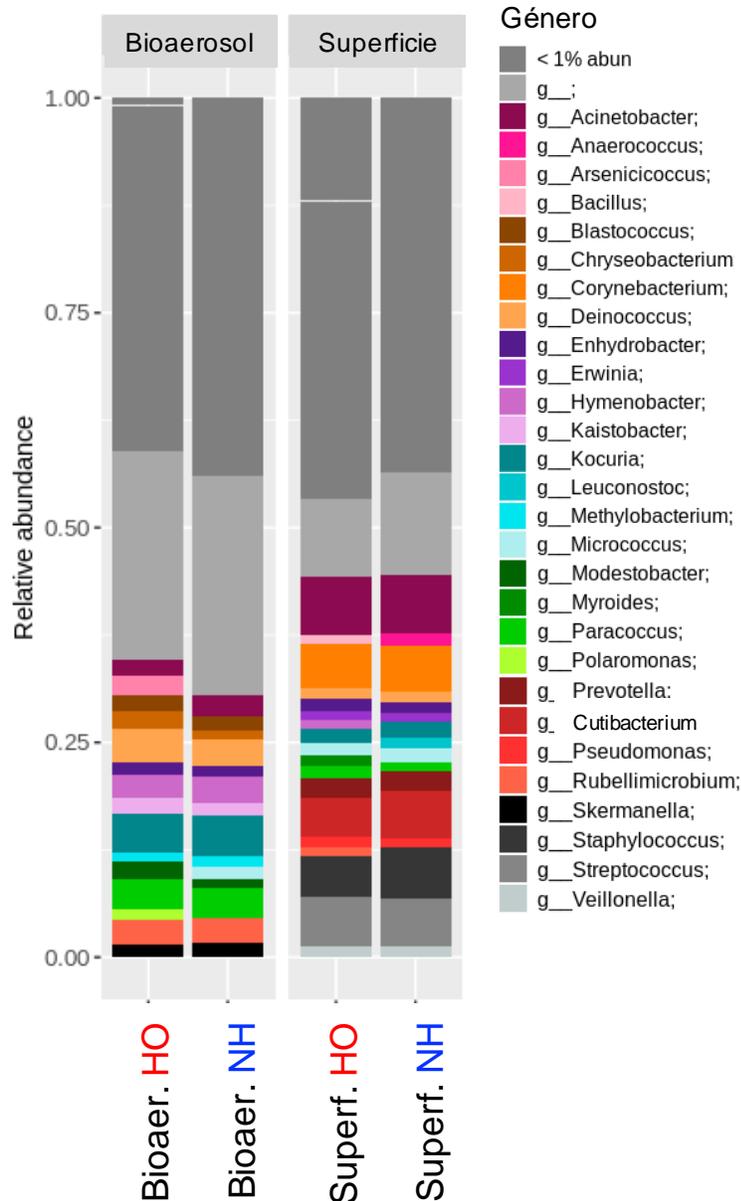


Figura 11. Taxonomía de géneros de las muestras de bioaerosol y de superficie de torniquetes de los ambientes hospitalario y no-hospitalario. Las ocho muestras de bioaerosol se colapsaron en dos barras, al igual que las 32 de superficie.

Posteriormente, para evaluar si existía diferencia entre las abundancias de géneros de las condiciones estudiadas, se compararon las muestras de superficie de hospital y no-hospital, y con resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$; prueba de Walt), se encontró que el género *Rubellimicrobium* perteneciente al Phylum Bacteroidetes se encuentra sobre representado en las superficies de torniquetes de estaciones cercanas a hospitales, mientras que *Hymenobacter*, del Phylum Proteobacteria, está sobre representado en las superficies de torniquetes de estaciones de no-hospital.

Respecto a la comparación entre bioaerosoles, hay 10 géneros sobre representados en las muestras de bioaerosol de hospital, mientras que en bioaerosol de no-hospital, hay 20 géneros sobre representados ($p < 0.0005$; prueba de Walt) (figura 12).

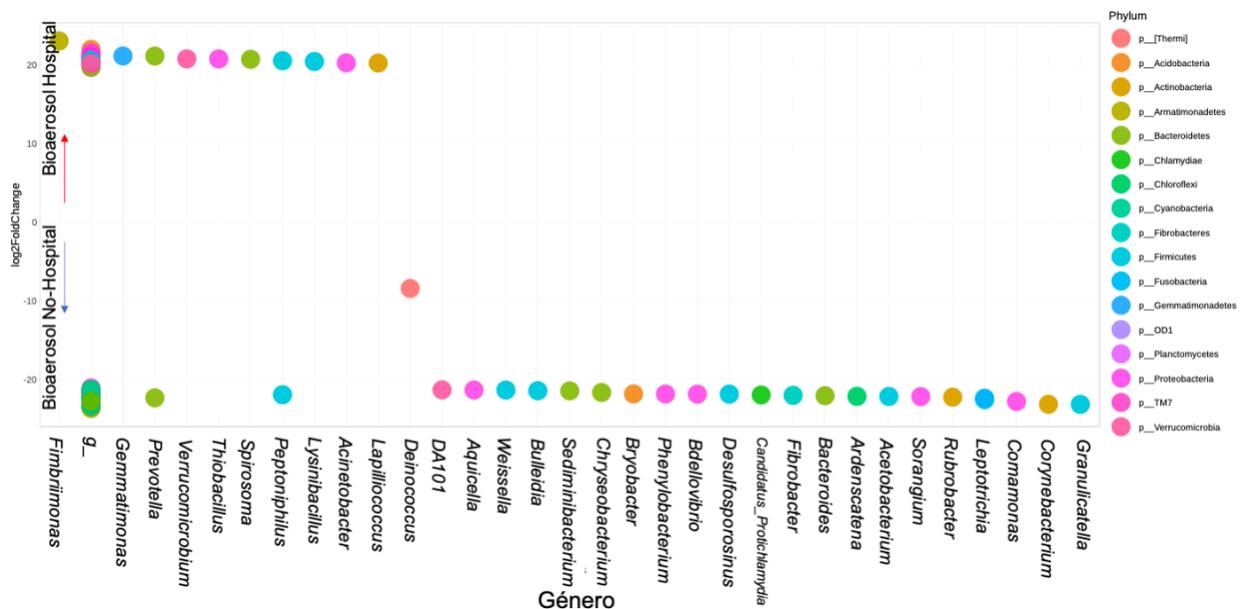


Figura 12. Abundancia diferencial de géneros en bioaerosoles de hospital y no hospital (\log_2 foldchange). Arriba se muestra en ambiente hospitalario y abajo en ambiente no hospitalario. Con un valor de $\alpha = 0.0005$.

2.4 Secuenciación de los metagenomas de bacterias cultivables de bioaerosoles.

Los subgrupos de ~300 UFCs de bacterias cultivables de bioaerosoles de cuatro estaciones tanto del interior como exterior, se juntaron de acuerdo con si pertenecían a ambientes hospitalarios o no-hospitalarios, así pues, las dos muestras de NH-1 (interior y exterior), se juntaron con las dos muestras de NH-2, dando un total de 1200 UFCs, lo

anterior aplicó de igual manera con las muestras de HO-1 y HO-2. El DNA obtenido a partir de las muestras de estos dos grupos de bacterias cultivables se envió a secuenciar para tener dos metagenomas de las bacterias cultivables de bioaerosoles de hospital y no-hospital. En la **tabla 5** se muestran los datos del procesamiento de ambos metagenomas (**Anexo IV** para cifras detalladas). Los *contigs* obtenidos se subieron a la plataforma de MG-RAST (*Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology*), que genera los perfiles de función y diversidad a través de la anotación de proteínas con distintas bases de datos homologadas. Para el caso de las bacterias cultivables del bioaerosol de hospital, se predijo que el 93% de las secuencias correspondían a proteínas, y a partir de dichas secuencias, se anotó el 65.9% para proteínas conocidas, 34% para proteínas desconocidas y 0.1% de RNA ribosomal. En el metagenoma de cultivable de bioaerosol de no-hospital, se utilizó el 91% de las secuencias totales, el 65.8% se anotó para proteínas conocidas, 34% para proteínas desconocidas y 0.2 % para RNA ribosomal.

Tabla 5. Datos de cifras generales del procesamiento de metagenomas de bioaerosoles de cultivables.

Muestra	Datos crudos	Pareadas Trimomatic	Contigs Spades	Contigs Velvet	No mapeadas	Contigs + no mapeadas >150	Proteínas prodigal
HOSPITAL	4,134,311/	3,994,772/					
# secuencias	4,134,311	3,994,772	508,172	282,386	698,302	1,249,230	1,322,801
long. total (pb)	622,014,508/	590,484,672/					
	622,424,343	588,355,065	244,559,683	43,755,873	102,231,552	360,679,680	
NO-HOSP	712,925/	681,289/					
# secuencias	712,925	681,289	137,425	115,138	269,043	414,342	412,125
long. total (pb)	105,271,701/	98580985/					
	105,341,898	98 480 724	45,284,670	18,006,986	38,513,034	88,779,178	

En la **figura 13**, se muestran los porcentajes de los subsistemas de funciones metabólicas para ambos metagenomas, se puede observar que las abundancias son muy parecidas entre sí, y los más abundantes corresponden a las rutas metabólicas de carbohidratos.

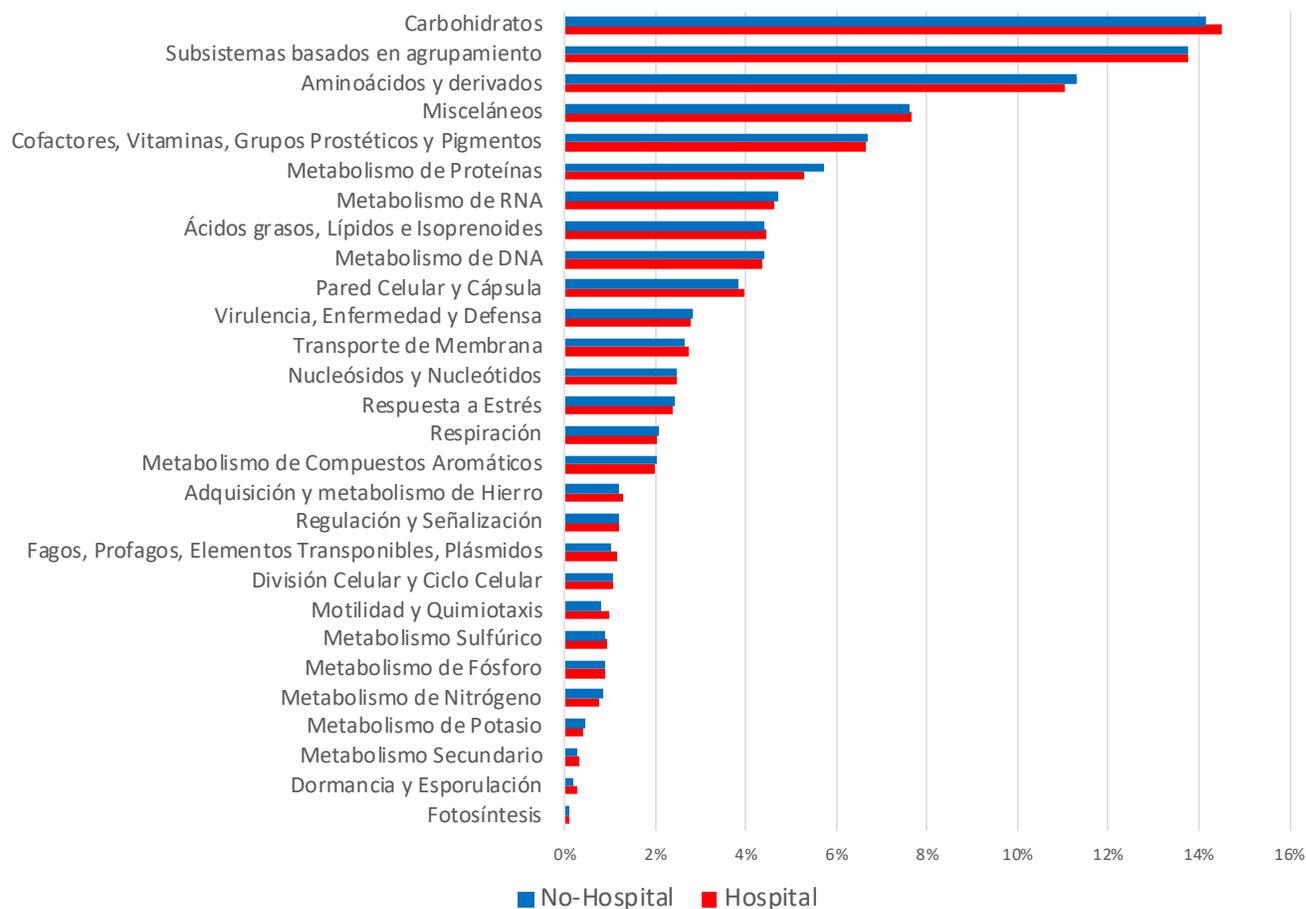


Figura 13. Abundancia porcentual de los subsistemas de las bacterias cultivables de bioaerosoles. Los porcentajes se obtuvieron a partir de la anotación de proteínas con MG-RAST.

2.4.1 Genes de resistencia a antibióticos

Las muestras de los metagenomas también permitieron hacer la identificación de potenciales genes de resistencia a antibióticos. Para ello, se hizo un BLASTp con la base de datos de CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*), que en noviembre 2019 contenía 2905 proteínas implicadas en mecanismos de resistencia a antibióticos.

Se identificaron 882 diferentes genes de resistencia en las muestras de bacterias cultivables de bioaerosol de estaciones de hospital, y 616 genes en el bioaerosol de cultivables de no-hospital. De dichos genes, 566 se compartieron en ambas condiciones, 316 fueron exclusivos de hospital y 50 de no-hospital. Se normalizaron y calcularon las

abundancias de genes con base en el número total de proteínas predichas por Prodigal (ver **tabla 5**). De los genomas de bacterias cultivables de bioaerosol de hospital, 0.06% son genes de resistencia a antibióticos, y en las bacterias cultivables de bioaerosol de no-hospital son 0.14%.

En la **figura 14** se muestra la abundancia relativa de los genes involucrados en la resistencia a antibióticos. En ambas muestras, el perfil es similar: la mayor abundancia la representa el gen *macB*, seguido por *abaF*, *bcrA* y *parY*.

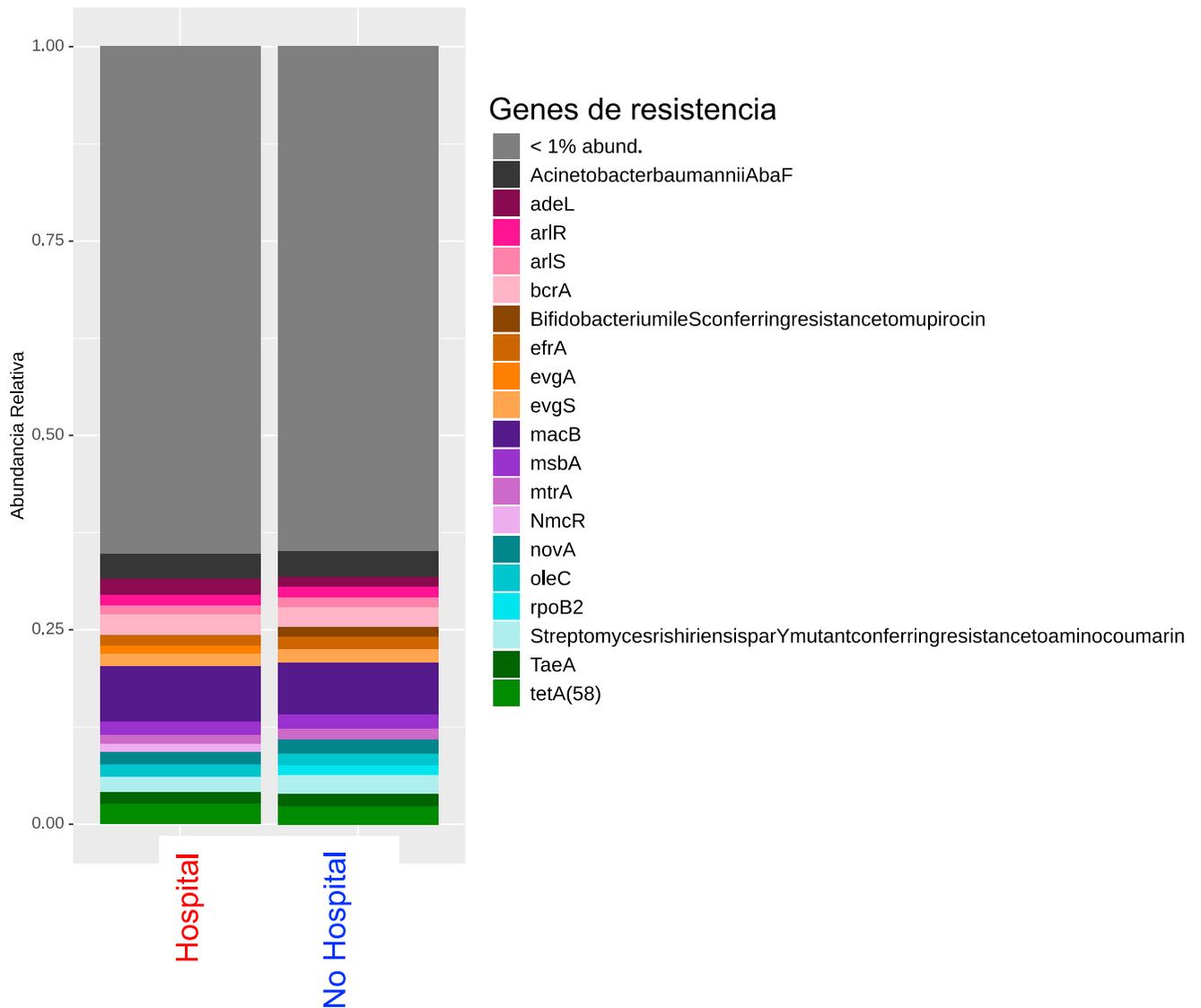


Figura 14. Abundancia relativa de genes de resistencia a antibióticos. Se colapsaron los genes <1% de abundancia. Del lado izquierdo se encuentran la abundancia de la muestra de bacterias cultivables de bioaerosol de hospital, y del lado derecho la de bacterias cultivable de bioaerosol de no-hospital.

Se agruparon los genes de resistencia en función de mecanismos de acción (**Figura 15**). En total se identificaron 6 mecanismos de resistencia y 3 en combinación. El más abundante, es el mediado por bombas de eflujo, seguido por la modificación del blanco del antibiótico, el menos abundante fue la combinación de bomba de eflujo y reducción de la permeabilidad. En la **Figura 16**, se muestran las clases de antibióticos a las que pudiera presentarse resistencia, en total son 109 clases distintas, pero se agruparon las <1% de abundancia, por lo que sólo se muestran las mayores al >0.5% de abundancia, que son 27, las clases más abundante es la de macrólidos, péptidos, fosfomicina y aminocumarina.

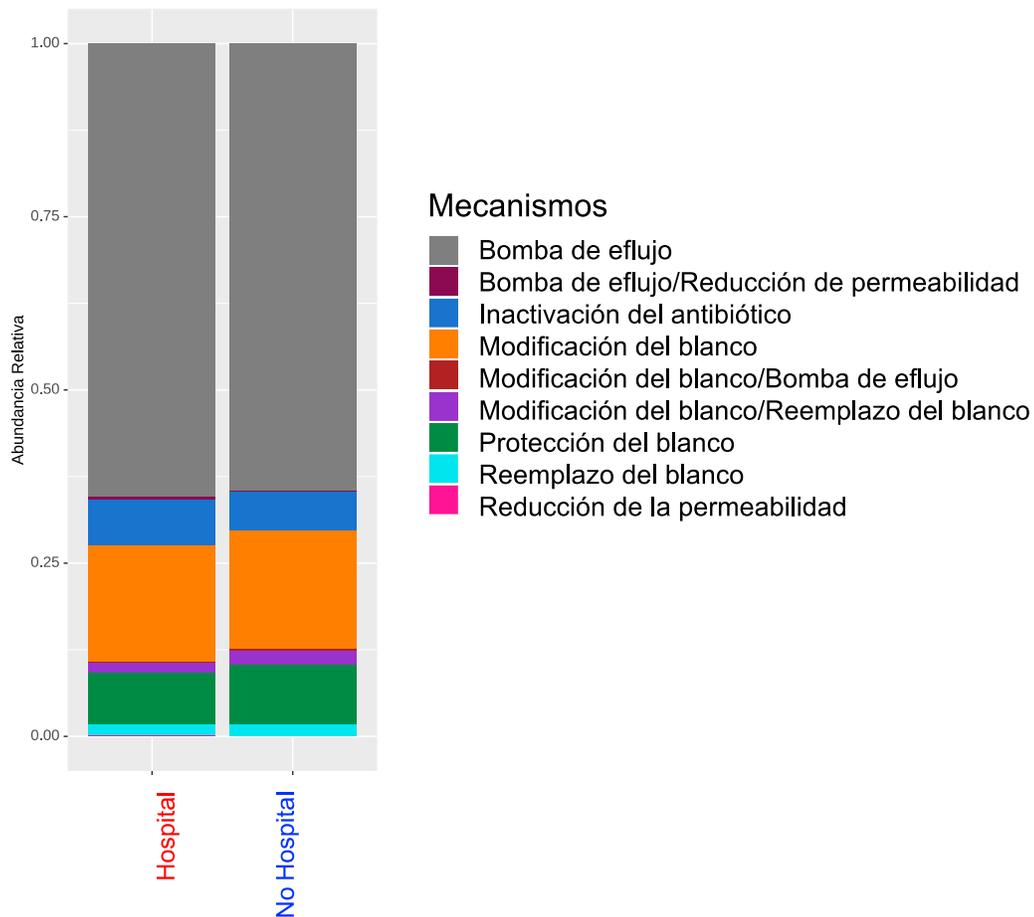


Figura 15. Abundancia relativa de los mecanismos de acción de los genes de resistencia a antibióticos. Se colapsaron los genes <1% de abundancia. Del lado izquierdo se encuentran las abundancias de la muestra de cultivable de bioaerosol de hospital, y del lado derecho las de cultivable de bioaerosol de no-hospital.

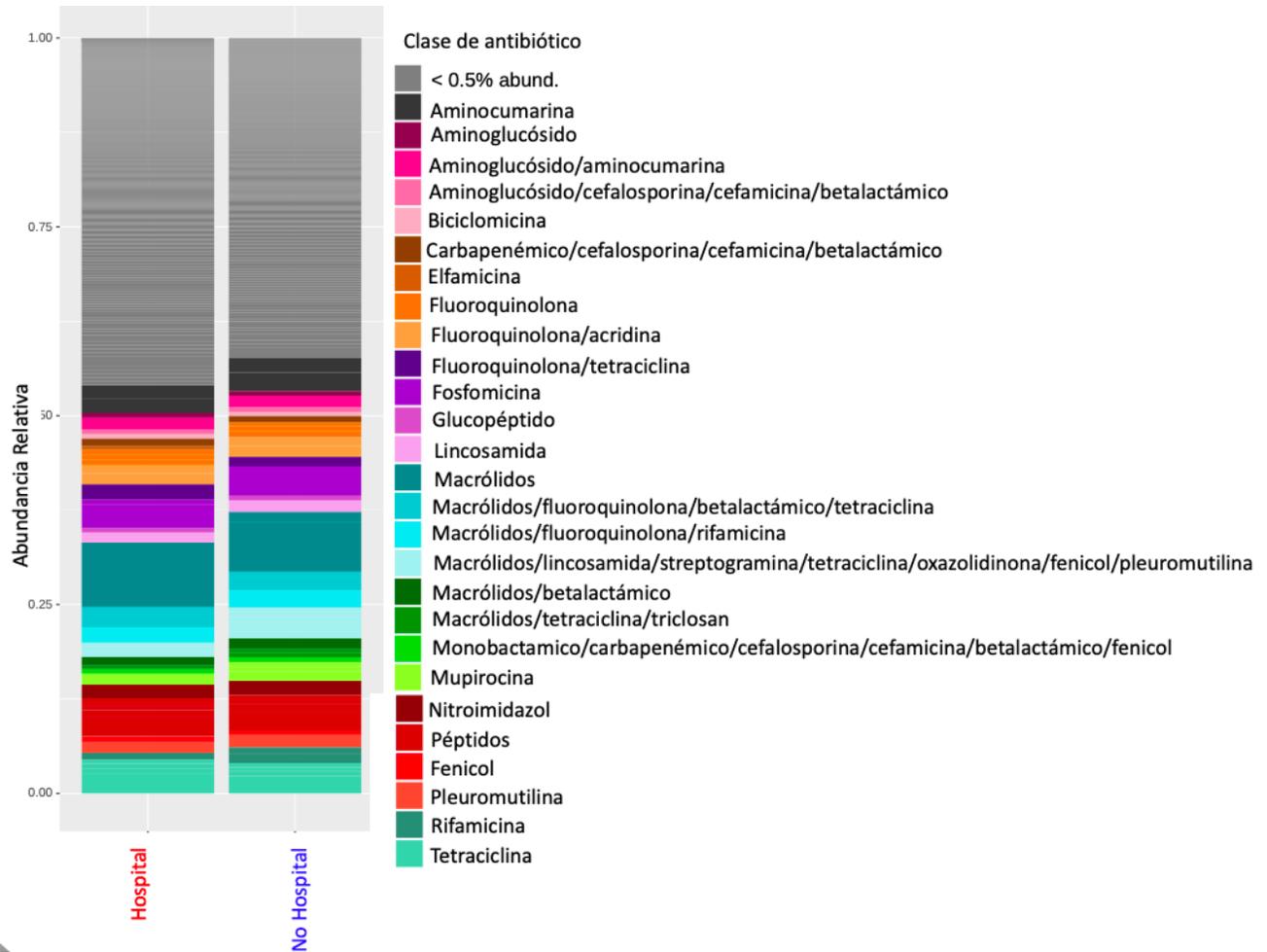


Figura 16. Abundancia relativa de los genes de resistencia agrupados por clases de antibiótico. Se colapsaron las clases <0.5% de abundancia. Del lado izquierdo se encuentran las abundancias de la muestra de cultivable de bioaerosol de hospital, y del lado derecho las de cultivable de bioaerosol de no-hospital.

En la **Figura 17**, se muestra la abundancia de las familias de resistencia antimicrobiana, en total se identificaron 179 distintas familias, pero se colapsaron las >0.1% de abundancia, así que se muestra la abundancia sólo de 38 familias. Las más abundantes son la bomba de eflujo tipo ABC, la bomba de eflujo de la superfamilia MFS, y la bomba de eflujo resistente a la nodulación y división celular.

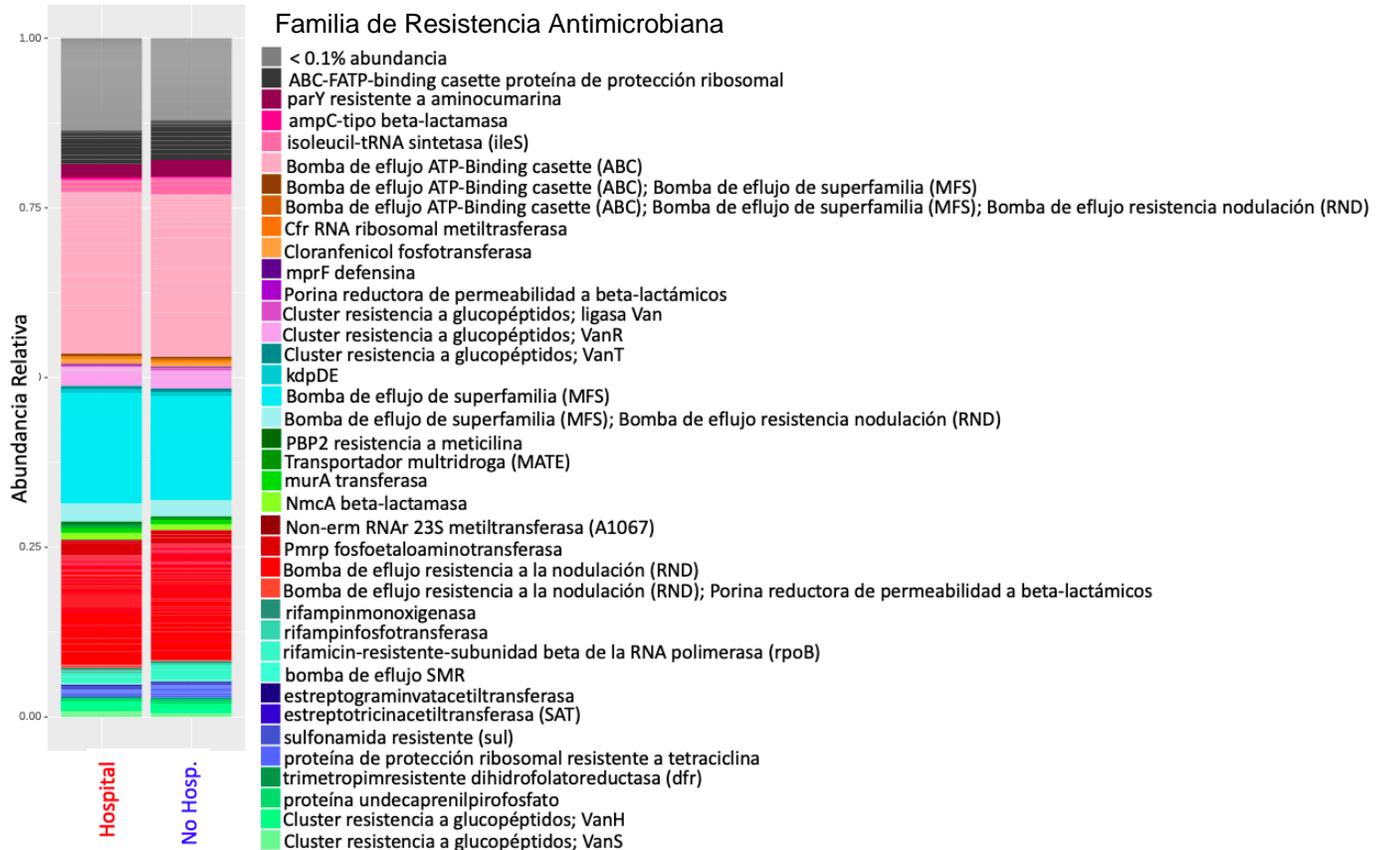


Figura 17. Abundancia relativa de familias de genes de resistencia a antibióticos. Se colapsaron las clases <0.1% de abundancia. Del lado izquierdo se encuentran las abundancias de la muestra de cultivable de bioaerosol de hospital, y del lado derecho las de cultivable de bioaerosol de no-hospital.

Para poder determinar si algunos genes se encontraban en sobre representación en alguna condición, se dividieron las frecuencias relativas y se seleccionaron los genes que estuvieran 3 veces más abundantes en el metagenoma de hospital respecto al de no-hospital, en la **tabla 6** se muestran los 20 genes sobre representados. El gen *bmr*, que codifica para un transportador, fue el más sobre representado al estar 8 veces más abundante en la muestra de bioaerosol de hospital que en la de no hospital. Se ha observado que este transportador genera resistencia a antibióticos como las fluoroquinolonas, doxorubicina, cloranfenicol y puromicina (Ahmed, *et al.*, 1995) (Neyfakh, *et al.*, 1991). Los genes que están también sobre representados presentan resistencia a antibióticos de distintas clases, principalmente los beta-lactámicos, glucopéptidos, péptidos, cloranfenicol y tetraciclinas.

Tabla 6. Genes sobre representados en el metagenoma de hospital.

Gen	# de veces sobre representado	Resistencia a Antibióticos*	Referencias
<i>bmr</i>	8	Fluoroquinolonas, doxorubicina, cloranfenicol y puromicina	(Ahmed, <i>et al.</i> , 1995) (Neyfakh, <i>et al.</i> , 1991).
<i>vanO</i>	6	Vancomicina y teicoplanina	(Gudeta, <i>et al.</i> , 2014)
<i>vanTN</i>	5	Vancomicina y teicoplanina	(Lebreton, <i>et al.</i> , 2011)
<i>tet(49)</i>	5	Tetraciclina	(Forsberg <i>et al.</i> , 2015)
<i>SAT-3</i>	5	Estreptotricina	(Tietze, <i>et al.</i> , 1990)
<i>gadX</i> ,	4	Eritromicina, beta-lactámicos.	(Nishino, <i>et al.</i> , 2008)
<i>acrA</i> (<i>Enterobacter cloacae</i>)	4	Ampicilina, penicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalotina, cefoxitina.	(Pérez, <i>et al.</i> , 2007)
<i>eptA</i>	4	Colistina	(Potron, <i>et al.</i> 2019)
<i>blt</i>	4	Fluoroquinolonas	(Ahmed, <i>et al.</i> , 1995)
<i>mdtG</i>	4	Fosfomicina	(Fabrega, <i>et al.</i> , 2010)
<i>emeA</i>	4	Fluoroquinolonas	(Jonas, <i>et al.</i> , 2001)
<i>pgpB</i>	4	Bacitracina	(Hynninen, <i>et al.</i> , 2009)
<i>AIM-1</i>	4	Beta-lactámicos	(Yong, <i>et al.</i> , 2012)
<i>tet(51)</i>	3	Tetraciclina	(Forsberg, <i>et al.</i> , 2015)
<i>mprF</i> (<i>Listeria monocytogenes</i>)	3	Cationic Antimicrobial Peptides	(Thedieck, <i>et al.</i> , 2006)
<i>tet(52)</i>	3	Tetraciclina	(Forsberg, <i>et al.</i> , 2015)
<i>catB2</i>	3	Cloranfenicol	(Parent, <i>et al.</i> , 1992)
<i>mprF</i> (<i>Clostridium perfringens</i>)	3	Daptomicina	(Ernst, <i>et al.</i> , 2009)
<i>mecl</i>	3	Meticilina	(García-Castellanos, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Erm(37)</i>	3	Macrólidos	(Andini y Nash, 2006)

*Se usó CARD como referencia.

2.4.2 Asignación taxonómica.

A partir de los metagenomas de bacterias cultivables se hizo la asignación taxonómica para identificar a los microorganismos. Se asignaron 51.63% de las secuencias de las bacterias cultivables de bioaerosol de hospital, y 56.81% de no-hospital.

En el metagenoma de hospital, se asignaron los dominios Bacteria (98.85%), Eukaryota (0.93%), Archaea (0.18%) y Virus (0.04%). En el metagenoma de no-hospital: Bacteria (98.69%), Eukaryota (1.13%), Archaea (0.15%) y Virus (0.03%). En la **tabla 7** se resumen las asignaciones más abundantes para los niveles taxonómicos de Phylum, Clase, Orden, Familia, Género y Especie. En todos los niveles taxonómicos, ambas muestras presentan similitudes en composición y abundancia, sin embargo, en los niveles de género y especie comienzan a observarse diferencias en composición.

Tabla 7. Asignaciones taxonómicas con mayor abundancia.

Nivel taxonómico	Metagenoma Hospital	Metagenoma No-Hospital
Phylum	Actinobacteria (44%) Proteobacteria (29%) Firmicutes (18%) Bacteroidetes (4%) Deinococcus-Thermus (2%) Otros (3%)	Actinobacteria (49%) Proteobacteria (37%) Firmicutes (6%) Bacteroidetes (4%) Deinococcus-Thermus (2%) Otros (2%)
Clase	Actinobacteria (45%) Bacilli (18%) Gammaproteobacteria (13%) Alphaproteobacteria (8%) Betaproteobacteria (7%) Otros (9%)	Actinobacteria (50%) Gammaproteobacteria (26%) Alphaproteobacteria (7%) Bacilli (6%) Betaproteobacteria (3%) Otros (8%)
Orden	Mirococcales (29%) Bacillales (17%) Pseudomonadales (9%) Corynebacteriales (9%) Burkholderiales (7%) Otros (29%)	Mirococcales (34%) Pseudomonadales (16%) Corynebacteriales (10%) Bacillales (5%) Enterobacterales (5%) Otros (30%)
Familia	Microbacteriaceae (14%) Micrococcaceae (13%) Bacillaceae (11%) Pseudomonadaceae (7%) Nocardiaceae (4%) Otros (51%)	Microbacteriaceae (18%) Micrococcaceae (14%) Pseudomonadaceae (10%) Moraxellaceae (7%) Nocardiaceae (5%) Otros (46%)
Género	<i>Bacillus</i> (10%) <i>Microbacterium</i> (8%) <i>Pseudomonas</i> (7%) <i>Arthrobacter</i> (5%) <i>Kocuria</i> (3%) <i>Rhodococcus</i> (3%) <i>Streptomyces</i> (3%) <i>Staphylococcus</i> (3%) <i>Masilia</i> (3%)	<i>Microbacterium</i> (14%) <i>Pseudomonas</i> (10%) <i>Kocuria</i> (6%) <i>Rhodococcus</i> (4%) <i>Acinetobacter</i> (4%) <i>Arthrobacter</i> (3%) <i>Brevundimonas</i> (3%) <i>Corynebacterium</i> (3%) <i>Staphylococcus</i> (2%)

	Otros (55%)	Otros (51%)
Especie	<i>Masilia oculi</i> (2%) <i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (1%) <i>Homo sapiens</i> (1%) <i>Paracoccus</i> sp. Arc7-R13 (1%) <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> (1%) <i>Deinococcus ficus</i> (1%) <i>Bacillus</i> sp. FJAT-22090 (1%) <i>Microbacterium oxydans</i> (1%) <i>Pseudomonas</i> sp. 02C 26 (1%) <i>Microbacterium foliorum</i> (1%) Otros (89%)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (5%) <i>Microbacterium foliorum</i> (3%) <i>Micrococcus luteus</i> (2%) <i>Kocuria rosea</i> (2%) <i>Kocuria indica</i> (1%) <i>Kocuria turfanensis</i> (1%) <i>Deinococcus swuensis</i> (1%) <i>Acinetobacter johnsonii</i> (1%) <i>Serratia marcescens</i> (1%) <i>Homo sapiens</i> (1%) Otros (82%)

6. Discusión.

El Sistema de Transporte Colectivo (Metro), representa el principal medio de movilización en la Ciudad de México y Área Metropolitana. Diariamente, en este espacio confluyen ~4.5 millones de personas. Los pasajeros, a su vez, traen consigo su huella microbiológica, y a través de interactuar con las distintas superficies (torniquetes, pasamanos de escaleras, tubos de vagones, asientos, piso, taquillas, máquinas de recarga de tarjetas, etc.) y el aire de interiores, los microorganismos se depositan y permanecen en las instalaciones. En este trabajo estudiamos la composición taxonómica del microbioma en el Metro, a través de la secuenciación de las regiones V3-V4 del gen de RNAr 16S de muestras de bioaerosoles y de superficie de torniquetes. Además, evaluamos la resistencia a antibióticos por medio de ensayos de resistencia con muestras de bacterias cultivables y con la secuenciación tipo *shotgun* de los genomas de bacterias cultivables de bioaerosoles.

6.1 Temperatura y humedad relativa.

Los metadatos de temperatura (°C) y humedad relativa (%) (**Tabla 2**) muestran que de manera general, la temperatura fue mayor en el interior de las instalaciones del Metro que en el exterior. Esto lo podemos atribuir a las condiciones del sistema de ventilación, que en ocasiones no resultan ser tan eficientes, en cambio, en la estación HO-2, que pertenece a la Línea 12 y que es la de construcción más reciente, la temperatura fue mayor en el exterior respecto al interior, lo que podría deberse a que las instalaciones de ventilación son más recientes. Respecto a las lecturas de humedad relativa, no parece

haber una relación entre interior y exterior de las instalaciones del Metro. Estos datos los tomamos en cuenta porque existe evidencia de que la temperatura y humedad relativa son factores que pueden influir en la composición microbiológica de un ambiente. Por ejemplo, en un estudio aerobiológico llevado a cabo en algunas estaciones del Metro de la CDMX, en diferentes estaciones del año, encontraron que el crecimiento de UFCs en época de invierno, tuvo correlación positiva con la temperatura, mientras que en época de calor, también hubo una correlación positiva con el porcentaje de humedad relativa (Hernandez-Castillo, *et al.*, 2014). En nuestro estudio no se encontró ninguna correlación con estas dos variables, ni con los datos de secuenciación del gen de RNAr 16S ni con los datos de bacterias cultivables de bioaerosoles.

6.2 Muestras cultivables y ensayos de resistencia a antibióticos.

Las muestras de bacterias cultivables de bioaerosoles se tomaron mediante el método gravitacional, por ello, no podemos comparar el número de UFCs que se obtuvo en cada estación y entre estaciones (**Tabla 3**), si bien la media de crecimiento fue mayor en los exteriores, esto se puede atribuir a que el flujo de aire es mayor afuera debido al tránsito mayor de personas, así como de automóviles. No obstante, dichas muestras las utilizamos para obtener lotes de 300 UFCs de cada condición y hacer los ensayos con nueve antibióticos pertenecientes a distintos mecanismos de acción. En promedio, tanto en bioaerosol como en superficie, observamos un porcentaje mayor de resistencia a los antibióticos neomicina (19%), eritromicina (17%) y ampicilina (10%), y un % menor con los antibióticos tetraciclina (1%), cloranfenicol (2%) y ciprofloxacina (2.5%) (**figura 5**). En el caso de nuestras muestras de bioaerosol, en 5/9 casos, los porcentajes de UFCs resistentes fueron mayores en las muestras de no-hospital, mientras que en el caso de superficie de torniquetes, en 6/9 los porcentajes fueron mayores también en las muestras de no-hospital. Existen otros estudios donde evaluaron también el porcentaje de resistencia a antibióticos, tal es el caso del Metro de Noruega, donde tomaron muestras de bioaerosoles, aislaron las UFCs y hallaron resistencia a los antibióticos: ácido nalidixico (75%), ampicilina (27%), tetraciclina (4%), estreptomina (9%) y cloranfenicol (5%). En un estudio llevado a cabo en el Metro de China, determinaron la presencia y

resistencia a antibióticos de aislados de cepas de *Staphylococcus* hallados en el aire y observaron un porcentaje mayor de resistencia al antibiótico mezclado de sulfametoxazol-trimetoprima, nitrofurantoina y penicilina. De los antibióticos que nosotros también utilizamos, ellos hallaron en el Metro que las cepas de *Staphylococcus* fueron resistentes a ampicilina (20%), eritromicina (30%), tetraciclina (6%) y ciprofloxacina (2%) (Zhou y Wang, 2013). En el estudio del metro de Nueva York, EUA (Afshinneko *et al.*, 2015), identificaron UFCs resistentes a los antibióticos kanamicina, cloranfenicol y ampicilina, que concuerda también con nuestros resultados.

Nosotros no observamos un patrón en el porcentaje de UFCs resistentes a antibióticos ni dependiendo el tipo de antibiótico, ni si la muestra era de superficie o de bioaerosol, ni de si la estación se encontraba cerca de un ambiente hospitalario o no-hospitalario. Esta última comparación (de ambiente), es de suma importancia en nuestro estudio, ya que existe suficiente evidencia de que lugares como los hospitales, granjas o plantas de aguas residuales, pueden actuar como reservorios de adquisición y dispersión de genes de resistencia antimicrobiana porque ejercen presión selectiva. Por ejemplo, en un estudio de China (Li, Y., *et al.* 2019), tomaron muestras de bioaerosoles a partir de sistemas de aire acondicionado en hospitales, granjas y casas en zonas urbanas y rurales, para comparar la distribución y abundancia de genes de resistencia, y encontraron significativamente más genes de tetraciclina, multirresistentes y macrólido-lincosamida-estreptogramina presentes en granjas, mientras que en hospitales, hubo mayor abundancia del subtipo del gen *bl3-cpha*, que codifica una betalactamasa.

6.3 Secuenciación masiva del gen de RNAr 16S.

El estudio de la composición del microbioma de un ambiente se hace a través de diversos biomarcadores, y para la fracción bacteriana se puede utilizar el gen de RNAr 16S. Nosotros hicimos la secuenciación masiva de las regiones V3-V4 de dicho gen de las muestras de bioaerosoles y de superficie de torniquetes. En total obtuvimos 41 827 OTUs.

La diversidad que observamos en las muestras de superficie de torniquetes, de acuerdo con el índice de Shannon (H') (**anexo V**), tanto de ambientes hospitalarios y no-hospitalarios, fue mayor que la diversidad observada en las muestras de bioaerosoles (**figuras 6 y 7**), la media fue de $H'=6$ y $H'=5.5$, respectivamente. Si comparamos, por ejemplo, la mucosa bucal tiene un índice de $H'=2$, la saliva de $H'=3$, la vagina de $H'=0.2$ y las heces de $H'=2.5$ (Li, *et al.*, 2012), los valores de índice de Shannon, nos muestran que de manera general, ya sea en bioaerosol o superficie de torniquete, el Metro es un ambiente altamente diverso. En un estudio llevado a cabo igualmente en el Metro de la Ciudad de México, donde se tomaron muestras también de superficie de torniquete; $H'=6.5$ y de pasamanos de vagones; $H'=6$ (Hernández, *et al.*, 2020), los índices de Shannon entre ambos estudios, son similares. Esto nos indica que quizá, la riqueza, independientemente de la temporada u hora de muestreo, permanece en un rango constante.

Respecto a las muestras de bioaerosoles ($H'=5.5$), observamos mayor diversidad que los bioaerosoles del metro de Barcelona, España ($H'=1.3$), aunque se debe tomar la consideración de que ellos hicieron su secuenciación a partir de la extracción de RNA, y nosotros la hicimos directamente a partir del DNA metagenómico, no obstante, la diferencia en órdenes de magnitud es amplia (Triadó-Margarit *et al.*, 2017). Lo mismo ocurre con el estudio del Metro de Oslo, Noruega (Gohli, *et al.*, 2019), donde tomaron también muestras de bioaerosol y de diversas superficies, sus valores de índice de Shannon en aire ($H'=2$) y en superficies ($H'=2$), son órdenes de magnitud menores que el que nosotros estamos reportando, sin embargo, ellos procesaron sus secuencias por medio de ASVs (Variantes de Secuencias de Amplicones), por lo que para hacer una comparación más precisa sería necesario rehacer los análisis de diversidad usando el mismo protocolo para todos los metros.

Llevamos a cabo la identificación taxonómica y encontramos que la mayoría de las bacterias pertenecen a los phyla Actinobacteria y Proteobacteria, mientras que los Firmicutes, se encuentran sobre representados en las muestras de superficie de torniquetes (**figura 9**). Estos phyla, también los han identificado como los de mayor

abundancia en los Metros de Barcelona, Nueva York, Boston, Hong Kong, Moscú, y Oslo (Afshinnkoo *et al.*, 2015; Gohli *et al.*, 2019; Hsu *et al.*, 2016; Klimenko *et al.*, 2020; Robertson *et al.*, 2013; Triadó-Margarit *et al.*, 2017). Y además, coincide con lo ya identificado en superficie de torniquete en el primer estudio de microbioma en el Metro de la Ciudad de México (Hernández *et al.*, 2020). Existe otro estudio llevado a cabo también en la Ciudad de México, donde tomaron muestras de bioaerosoles en el techo del edificio de Ciencias Atmosféricas, y también fueron dichos tres Phyla los que se identificaron en mayor abundancia (Serrano-Silva y Calderón-Ezquerro, 2018).

El phylum Actinobacteria es el grupo que consiste de bacterias Gram-positivas con alto contenido de G+C en su DNA, que pueden vivir en diversos ambientes, como suelo, comensales de plantas, fijadores de nitrógeno, en el tracto gastrointestinal de humanos, en ambientes acuáticos y también comprende algunos patógenos. Además, géneros como *Streptomyces*, han servido para aislar antibióticos (Ventura *et al.*, 2007). También tiene una alta prevalencia en el microbioma de la piel, que si bien varía dependiendo el sitio, su abundancia es alta, como ejemplos podemos mencionar a *Cutibacterium* y *Corynebacterium* (Grice *et al.*, 2009).

El phylum Proteobacteria, que comprende la mayoría de bacterias Gram-negativas, representa uno de los grupos más diversos del dominio Bacteria, y su principal motivo de estudio, es que incluye a la mayoría de bacterias patógenas no sólo de humanos, sino también de animales y plantas (Gupta, 2000). Se ha identificado también en el microbioma de piel de humanos, aunque en mucho menor abundancia que Actinobacteria y Firmicutes, pero que también contribuyen a la homeostasis de este nicho (Cosseau *et al.*, 2016), también se encuentra en baja proporción en el microbioma intestinal, sin embargo, debido a que se piensa que las proteobacterias son una de las fuentes principales de genes de importancia metabólica (Bradley y Pollard, 2017) se ha propuesto que un incremento en miembros del Phylum Proteobacteria, sea una firma de diagnóstico de disbiosis del microbioma intestinal (Shin, *et al.*, 2015).

Los Firmicutes, que son bacterias Gram-positivas y a diferencia de las Actinobacterias, con bajo contenido de G+C, y cuya principal característica es que la mayoría de los géneros son capaces de formar esporas, son capaces de resistir a condiciones de estrés

ambiental, como calor y desecación, por ello, son capaces de sobrevivir en varios ambientes ya sea acuáticos o de suelo (Galperin, 2013). También se ha identificado en el microbioma oral de humanos, en específico la clase Bacilli (Belda-Ferre *et al.*, 2012) y tiene especial interés en el estudio de la obesidad, dado a que se ha observado una correlación positiva de este Phylum con personas con dicha condición (Million, *et al.*, 2013).

En específico, estos tres Phyla (Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes), también se han identificado en diversos tipos de ambientes interiores, como en casas, sanitarios públicos, oficinas, aviones y escuelas (Chase *et al.*, 2016; Flores *et al.*, 2011; Hanson *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2015; Weiss *et al.*, 2019). O incluso en objetos con los que los humanos tenemos alta frecuencia de contacto, como los teléfonos celulares o el dinero (Heshiki *et al.*, 2017; Meadow, *et al.*, 2014)

Los géneros que nosotros identificamos con mayor abundancia en las muestras de bioaerosoles, fueron *Kocuria*, *Deinococcus*, y *Paracoccus* (**Figuras 10 y 11**). El género *Kocuria* es una actinobacteria presente en microbiomas de piel de mamíferos sin embargo, también se ha recopilado evidencia de que puede causar infecciones a humanos con un sistema inmune comprometido (Savini *et al.*, 2010). *Deinococcus*, comprende especies que tienen la principal característica de ser radiorresistentes (Krisiko y Radman, 2013). Varias especies de *Deinococcus* se han aislado anteriormente en muestras de aire de exteriores (Weon *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009, 2010) y en muestras de aire de interiores como casas (Adams, *et al.*, 2014), es probable que pueda resistir a las condiciones ambientales por el hecho de que soporta estrés ambiental, y debido al intercambio de aire se puede identificar tanto en el exterior como en el interior. La proteobacteria *Paracoccus*, ha sido principalmente estudiada porque pueden utilizar como sustratos una gran variedad de compuestos y por tanto, son capaces de sobrevivir en diversos ambientes (Baker *et al.*, 1998). De igual manera existe evidencia de que está presente en aire de interiores y exteriores (Serrano-Silva y Calderón-Ezquerro, 2018; Yassin y Almouqatea, 2010).

En el metro de Oslo, los géneros más abundantes en aire son *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Rubrobacter*, *Sphingomonas* e *Hymenobacter* (Gohli *et al.*, 2019).

En los bioaerosoles del metro de Nueva York (Robertson *et al.*, 2013), abundan principalmente las familias: Staphylococcaceae, Moraxellaceae, Micrococcaceae, Enterobacteriaceae y Corynebacteriaceae. Mientras que en los bioaerosoles del metro de Hong Kong, China (Leung, *et al.*, 2014), los géneros más abundantes fueron *Micrococcus*, *Enhydrobacter*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*. En el metro de Barcelona, es *Methylobacterium*, seguido de miembros de la familia Chitinophagaceae, *Bradyrhizobium*, *Paracoccus* y *Sphingomonas* (Triadó-Margarit *et al.*, 2017). Nosotros también identificamos la presencia de todos estos géneros, en alta abundancia en superficie de torniquetes, en los bioaerosoles también se identificaron, pero no dentro de los más abundantes.

Los géneros que nosotros identificamos con mayor abundancia en la superficie de torniquetes fueron *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (**Figuras 10 y 11**). Nuestros resultados de composición bacteriana, son más parecidos a los observados en las superficies del metro de Boston (Hsu *et al.*, 2016), donde también dominan las bacterias *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, y *Streptococcus* en comparación al estudio de superficies del metro de Hong Kong, China (Kang *et al.*, 2018), con la presencia de *Cutibacterium*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* y *Staphylococcus*. En el metro de Oslo, los géneros los más abundantes en superficies son *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, *Streptococcus*, *Hymenobacter* y *Corynebacterium* (Gohli *et al.*, 2019). En otro estudio igualmente llevado a cabo en el metro de Nueva York, pero de superficies (Afshinnekoo *et al.*, 2015), los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Lysinibacillus*.

El estudio que más contrasta con nuestros resultados es el de las superficies del metro de Moscú, Rusia, donde los géneros que abundan son: *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Dietzia*. En dicho estudio, la diversidad microbiana correlacionó positivamente con el flujo de pasajeros (Klimenko *et al.*, 2020).

Acinetobacter, es una bacteria ubicua, que se ha encontrado en ambientes de agua, suelo, piel y mucosas de humano (Doughari, *et al.*, 2011), es reconocida por ser un agente causal de infecciones nosocomiales (Bergogne-Bé, Zin, y Towner, 1996), y se ha

demostrado que puede resistir en superficies inanimadas durante días debido a su resistencia principalmente a la desecación (Wendt, *et al.*, 1997). *Corynebacterium* además de habitar la piel de humanos, y también puede ser un patógeno oportunista (Bernard, 2012). Un dato interesante respecto a este género, es que se ha propuesto como parte de las bacterias que se podrían utilizar para diferenciar sexo, en este caso, por encontrarse mayormente asociado a hombres que mujeres (Luongo *et al.*, 2017). *Cutibacterium*, en específico *P.acnes*, está ampliamente estudiado debido a la implicación que tiene en el acné, y si bien aún no está claro el mecanismo, sí se sabe que está relacionado, sin embargo, es un comensal habitual de la piel (Fitz-Gibbon *et al.*, 2013) al igual que *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

El que nosotros hallamos identificado a dichas bacterias y que la mayoría se encuentren asociadas a piel o mucosas de humano, coincide con la evidencia de que una de las principales fuentes de microorganismos en interiores, como el Metro, son los humanos, (Hospodsky *et al.*, 2012; Lax *et al.*, 2014), así como el aire de los exteriores (Prussin II y Marr, 2015). Los accesos al Metro, son sitios que no cuentan con ninguna protección que impida el flujo de entrada del aire de exterior, por ello el intercambio de microorganismos es frecuente y por ende, también se pueden identificar microorganismos ambientales de agua o suelo. Pero sin duda, el flujo de humanos, es la principal fuente de microorganismos que estructuran el microbioma del Metro, si bien cada persona tiene su propia nube microbiana (Meadow *et al.*, 2015), los géneros más abundantes e individuos sanos promedio, se comparten, y por ello vemos que la diversidad microbiana observada en la piel, cavidad oral, mucosas, e incluso intestinal, permanece en el Metro de la Ciudad de México. Además, nuestros resultados son equiparables con la mayoría de lo reportado por investigaciones en otros países, no obstante, las diferencias podrían deberse al número de pasajeros por día, por ejemplo, el metro de Barcelona, transporta 1.25 millones/día (Triadó-Margarit *et al.*, 2017), mientras de Moscú transitan alrededor de 7 millones/día, (Klimenko *et al.*, 2020), que son extremos casi opuestos a lo que ocurre aquí en México, con 4.5 millones/día. Otro factor podrían ser el estilo de vida de las poblaciones, ya que existe evidencia de que hábitos principalmente de alimentación e

higiene, impactan en la estructuración y composición de los microbiomas (*Yatsunenko et al.*, 2012).

Al analizar la diversidad beta, pudimos observar que la composición de OTUs, de cada una de las 40 muestras, se agrupa en función del sitio de donde se tomó la muestra, es decir, si proviene de la superficie de un torniquete o de bioaerosol, no así si la estación de Metro se encuentra cercana o alejada de un ambiente hospitalario (**Figura 8**). La aparente falta de observación de la señal de los hospitales, la atribuimos al elevado flujo de personas, es decir, que el aporte microbiológico al interior del Metro es tan elevado, que diluye el aporte de microorganismos provenientes de ambientes hospitalarios. No obstante, sí hay microorganismos que hallamos sobre representados, tal es el caso de *Rubellimicrobium*, que lo identificamos 2.5 órdenes de magnitud más en la superficie de torniquetes de hospital. Dicho género es ambiental, se ha aislado de suelos (*Dastager, et al.*, 2008) y no se ha reportado como patógeno. Por el contrario, identificamos a *Hymenobacter* como género sobre representado en la superficie de torniquetes de no-hospital, y ha sido identificada en ambientes como aire (*Buczolits et al.*, 2002), agua (*Baik et al.*, 2006) y suelo (*Kim, et al.*, 2008).

En los bioaerosoles, identificamos también géneros sobre representados, en el caso de ambientes hospitalarios, pero sólo *Peptoniphilus*, se ha visto involucrada en procesos de infección en humanos (*Citron, et al.*, 2012), mientras que en la superficie de ambientes no-hospitalarios, *Leptotrichia* (*Eribe y Olsen*, 2008) y *Corynebacterium* son los únicos géneros que se pueden asociar a infecciones.

No obstante, queremos hacer énfasis en recordar que a partir de los datos de secuenciación masiva del gen de RNAr 16S, no podemos confirmar que cualquiera de éstos géneros sean patógenos, dado a que no se tiene la información de los genes que pudieran estar implicados en los mecanismos de patogenicidad.

6.4 Secuenciación del metagenoma de cultivables de bioaerosoles e identificación de genes de resistencia a antibióticos.

Uno de los objetivos de nuestro proyecto, es también determinar un primer panorama de la presencia y abundancia de los genes de resistencia a antibióticos, dado la problemática actual de salud. Por ello, secuenciamos los dos lotes de bacterias cultivables de bioaerosoles de hospital y no-hospital. De acuerdo con la asignación taxonómica funcional, los subsistemas de metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, cofactores, vitaminas y de proteínas, fueron los de mayor abundancia, esto tiene total congruencia porque son de las funciones metabólicas mínimas que pueden poseer los microorganismos (**Figura 13**), y por tanto no se observa una diferencia entre subsistemas.

Cuando hicimos la identificación de genes de resistencia a antibióticos con la base de datos de CARD, observamos que el gen con mayor abundancia en ambos metagenomas, es *macB*, el cual es un transportador de tipo ABC presente en bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter baumannii*. MacB, en conjunto con MacA, una proteína adaptadora, expulsa antibióticos, toxinas peptídicas, sideróforos, lipopolisacáridos y protoporfirinas (Okada *et al.*, 2017), Confiere resistencia a antibióticos como macrólidos, aminoglucósidos y polimixinas (Greene, *et al.*, 2018). Esta bomba de eflujo actúa por un mecanismo de mecanotransmisión que en realidad es un sistema macAB-TolC, donde además de la ATPasa MacB, se requiere a MacA, la proteína adaptadora periplásmica y TolC que es el ducto por el que se bombean las moléculas (Greene *et al.*, 2018). El gen *macB* sí lo pudimos identificar en alta abundancia relativa en nuestros metagenomas, mientras que *macA* y *tolC* de igual manera, pero en menor abundancia, lo cual sugiere que dicho mecanismo de resistencia se encuentra presente.

Otro gen de resistencia que identificamos, es *abaF*, una bomba de eflujo de la superfamilia MFS (Sharma *et al.*, 2017), que se ha caracterizado en *Acinetobacter baumannii* y que confiere resistencia a fosfomicina, pero además, participa en la formación de biopelículas (Abdi *et al.*, 2020). Las bombas de esta superfamilia, participan

también en otros procesos fisiológicos de homeostasis en bacterias, sobre todo en cuanto al transporte de glucosa (Yan, 2013). Por ello, se piensa que de la totalidad de *abaF*, no todas están involucradas en el proceso de resistencia.

Los siguientes genes en abundancia que identificamos son *bcrA*, que también codifica para una bomba de eflujo y *parY*, que es una subunidad de una topoisomerasa tipo II, que han observado que confiere resistencia a la aminocumarina (Schmutz *et al.*, 2003). De la totalidad de genes que identificamos, la mayoría pertenecen al mecanismo de bombas de eflujo, lo cual es de esperarse, dado a que como ya se mencionó, las bombas de eflujo cumplen otras funciones biológicas, es decir, que no son exclusivas para conferir resistencia a antibióticos. El segundo mecanismo más observado es la modificación del blanco del antibiótico.

La distribución y tipo de genes de resistencia que encontramos en ambos metagenomas, fue similar entre sí, sin embargo, identificamos una serie de genes (**tabla 6**), que se encuentran sobre representados al menos tres veces en las bacterias aisladas del bioaerosol de hospital. El gen *bmr* (sobre representado 8 veces), codifica para una bomba de eflujo perteneciente a la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) y se ha identificado en microorganismos como *Bacillus subtilis* (Pidcock, 2006),

El gen *vanO*, se ha identificado, en bacterias Gram-positivas, como *Rhodococcus equi*, es parte de un operón con localización en el cromosoma (Giguere, *et al.*, 2018) y promueve la resistencia a glucopéptidos, tales como la vancomicina (Gudeta *et al.*, 2014). Otro de los genes sobre representados en hospital, es *vanTN*, que codifica a una serin-racemasa, y confiere resistencia a glucopéptidos mediante la síntesis de precursores de peptidoglucanos. El gen *vanTN* se ha identificado en enterococos como *E. faecium*, que es un patógeno oportunista (Depardieu y Courvalin, 2017).

La diferencia en la sobre representación de estos genes en el bioaerosol de hospital, puede ser evidencia de que el hospital sí ejerce presión selectiva en las bacterias para la adquisición de dichos genes mas no en la composición y estructuración del microbioma que observamos con los datos de secuenciación masiva del gen RNAr 16S. No obstante,

ya tenemos un panorama general de qué tipos de mecanismos de resistencia se encuentran en las bacterias del microbioma del Metro de la Ciudad de México.

Respecto a las bacterias cultivables que pudimos aislar e identificar, la mayoría correspondieron a los phyla Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes, es decir, los mismos Phyla que obtuvimos con nuestros datos de secuenciación masiva del gen de RNAr 16S, no obstante, de los lotes de cultivables sabemos que todos son aerobios y que se encuentran en estado viable en los bioaerosoles del Metro, lo cual es importante diferenciar. Estos géneros son: *Bacillus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Kocuria*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* y *Acinetobacter* (**Tabla 7**). Los géneros más abundantes ya los habíamos identificado con el método independiente de cultivo, y si bien la mayoría se asocian principalmente a humano, también son ubicuos y se pueden encontrar en otros ambientes (Doughari *et al.*, 2011). Nuestros resultados concuerdan con el estudio del metro de Noruega, porque en sus aislados, los géneros dominantes fueron *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* y *Streptomyces* (Dybwad *et al.*, 2012).

Nuestros resultados son comparables, con un estudio llevado a cabo en el metro de Seoul, Corea del Norte, donde también aislaron bacterias presentes en el aire, e identificaron que principalmente eran de los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Kocuria* y *Corynebacterium* (Hwang *et al.*, 2016). En otro estudio, de donde aislaron bacterias cultivables de una sala de hospital, los géneros más abundantes que identificaron son: *S. epidermis*, *S. hominis*, *Bacillus sp.* Y *Micrococcus luteus* (Gilbert, *et al.*, 2010). En nuestros dos metagenomas también encontramos *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Kocuria* y *Corynebacterium*, pero en menor abundancia. Con esta evidencia, se confirma lo que ya han observado otros estudios, que los bioaerosoles de interiores están compuestos principalmente por la aerolización de los microorganismos de humanos y en menor proporción los ambientales.

Es interesante saber que el sistema de transporte Metro en apariencia es bastante homogéneo, y si bien no pudimos concluir que el aporte del exterior inmediato influye de manera significativa en la composición de bacterias y de genes de resistencia que se encontraron en el interior de las estaciones del Metro, ya tenemos una primera evidencia

de los mecanismos de resistencia presentes. Nuestras observaciones son diferentes respecto al estudio del metro de Nueva York (Afshinneko *et al.*, 2015), donde sí identificaron el impacto del microbioma del exterior al interior de las estaciones de metro.

En México, no existe la información desglosada ni concisa de cuáles son los antibióticos de mayor consumo entre la población, sin embargo, un estudio reciente (Miranda-Novales *et al.*, 2019), trata de recabar la información de que antibióticos son los que se prescriben con mayor frecuencia en los hospitales, de acuerdo con los datos de sus respectivos departamentos farmacéuticos, y ellos concluyen que los antibióticos más consumidos en los últimos años, pertenecen a los grupos de cefalosporinas, carbapenémicos, vancomicina y penicilina. No obstante, los mismos autores resaltan que no necesariamente el análisis en estos hospitales es un reflejo de la situación en todo el país, pero puede sugerir las tendencias nacionales.

Además, existen otro par de estudios donde a través de los datos de ventas de las farmacéuticas en la década pasada, el mayor consumo era de penicilinas, macrólidos, cefalosporinas y quinolonas (Santa-Ana-Tellez *et al.*, 2013; Van Boeckel *et al.*, 2014). Si bien nosotros identificamos resistencia a la mayoría de estos antibióticos en el Metro de la Ciudad de México, no podemos asegurar que se deba a la presión selectiva de los hospitales, porque la adquisición y dispersión de los genes de resistencia en este caso, también puede deberse a eventos independientes a las actividades humanas. Por los resultados obtenidos, lo más probable es que sean ambos eventos los que estemos observando en el Metro, ya que no se observó una señal fuerte en estaciones cercanas a hospitales.

7. Conclusiones.

- a) Identificamos la composición del microbioma del aire del Metro de la Ciudad de México con técnicas independientes de cultivo. Hallamos bacterias asociadas al humano y al suelo. Las más abundantes en aire son: *Deinococcus*, *Kocuria*, *Paracoccus* y *Rubellimicrobium*.

- b) Identificamos la composición microbiana en superficie de torniquetes, donde los géneros más abundantes son: *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*, y los cuales son asociados principalmente al humano. Esta observación coincide con estudios previos.
- c) Aislamos colonias (UFCs) resistentes a 9 antibióticos distintos. Las resistencias más comunes fueron a eritromicina (17%) y neomicina (19%).
- d) En los genomas de bacterias cultivables de aire, identificamos 1.3% y 1.0% de genes de resistencia a antibióticos en las muestras de hospital y no-hospital, respectivamente.
- e) Los genes más abundantes relacionados a la resistencia a antibióticos en las bacterias cultivadas son: *macB*, *abaF*, *bcrA* y *parY*. Encontramos en sobre representación a los genes *bmr* y *vanO* en las bacterias de aire de estaciones de metro cercanas a hospital.
- f) No encontramos evidencia significativa ni en la composición bacteriana ni en los genes de resistencia a antibióticos, entre las estaciones de Metro cercanas a hospitales y las no-cercanas a hospitales.
- g) El presente trabajo nos permite tener un mayor conocimiento de con qué tipo de bacterias interactúan a diario las personas pasajeras de este medio de transporte, ya sea a través del contacto con superficies (de torniquetes, en este caso), y a través de la respiración de bioaerosoles.
- h) Con los experimentos independientes de cultivo podemos observar la diversidad de bacterias presentes a las que las personas estamos expuestas.
- i) Con los experimentos dependientes de cultivo, vimos una muestra de las bacterias que se encuentran en estado viable y son resistentes al menos a un antibiótico.

Es preocupante la proporción de bacterias resistentes que pudieran funcionar como reservorio, sabemos que este es un problema de salud creciente.

- j) Nuestro estudio lo llevamos a cabo antes de la pandemia de COVID-19 declarada a inicios del año 2020, sin embargo, este escenario nos permitió reafirmar la importancia de estudio de la presencia y dinámica de microorganismos presentes en ambientes tanto interiores como exteriores. Esto para tener un mayor control y prevención de transmisión de organismos infecciosos e incluso una mejor toma de decisiones respecto a cómo puede ser nuestra interacción en espacios públicos con mucha afluencia, como lo es el metro.

8. Perspectivas.

Con los resultados obtenidos en nuestra investigación, pudimos observar que en apariencia el aporte de bacterias y genes de resistencia por parte del hospital hacia el interior de las estaciones de Metro, pareciera no ser muy abundante, con lo anterior no contradecimos la vasta evidencia de que los hospitales son espacios donde se promueve la adquisición y dispersión de mecanismos de resistencia, por ello, tomar muestras al interior de los hospitales podría mostrar si la señal de resistencia se va “diluyendo” en el camino hacia el Metro, o simplemente es tan diversa la riqueza en el Metro, que por ello no se observa una alta señal de hospital.

Debido a la problemática de salud pública que representan las bacterias multi-resistentes, también se podrían efectuar mayor cantidad de ensayos de resistencia con las UFCs que ya aislamos, para saber si presentan multi-resistencia a al menos los antibióticos que nosotros utilizamos.

Se podrían obtener los metagenomas de la superficie de torniquetes y del aire para hacer la comparación directa de la distribución y abundancia de los genes de resistencia en al menos estos sitios.

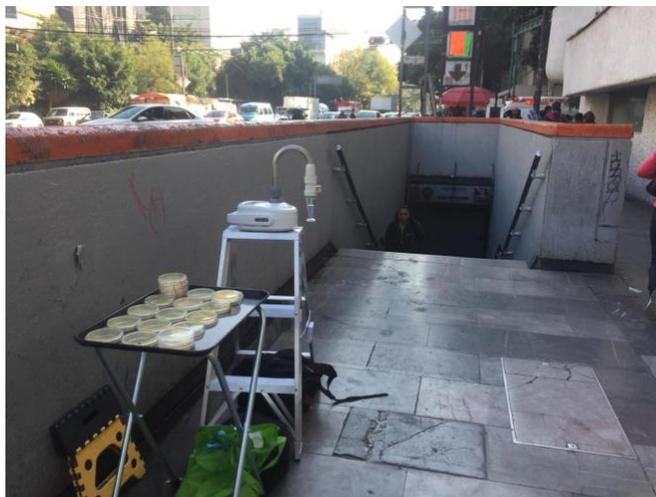
Dado a que existe evidencia de que la hora puede influir en la distribución de los genes de resistencia, se podrían hacer estudios longitudinales para saber cómo cambia dicha distribución básicamente en el día-noche.

Con los datos que nosotros obtuvimos de la secuenciación de los dos lotes de genomas de bacterias cultivables de aire de hospital y no-hospital, se podría hacer también el estudio de la abundancia y distribución de genes implicados en los procesos de patogenicidad y del mobiloma.

Mucho se ha estudiado sobre la resistencia a antibióticos, pero aún quedan muchas preguntas por contestar.

9. Anexos.

ANEXO I.



A

B

Sistema de toma de muestras con el aspirador Coriolis μ Biological Air-Sampler® (Bertin Instruments) para bioaerosoles, y cajas con medio LB expuestas. El aspirador se colocaba sobre una escalera, quedando una altura de 1m, aproximadamente, sobre el nivel de piso, al igual que el soporte de la base con las cajas de Petri. En el interior de la estación se hizo en un lugar medio del andén (A), y al exterior de la estación, cercano a la entrada/salida (B).

ANEXO II

Datos de cuantificación de DNA metagenómico.

ID*	ESTACIÓN/ORIGEN MUESTRA	TIPO	VOL. (uL)	C (ng/uL)	Masa total (ng)	260/280	260/230
SJ-1	SAN JUAN LETRÁN/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	5.1	168.3	1.45	0.85
SJ-2	SAN JUAN LETRÁN/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	1	33	1.38	1.03
SJ-3	SAN JUAN LETRÁN/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	3.4	112.2	1.35	0.85
SJ-4	SAN JUAN LETRÁN/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	4.5	148.5	1.37	0.77
SJ-5	SAN JUAN LETRÁN/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	3.8	125.4	1.40	0.64
SJ-6	SAN JUAN LETRÁN/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	3.1	102.3	1.16	0.81
SJ-7	SAN JUAN LETRÁN/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	1.7	56.1	1.13	0.94
SJ-8	SAN JUAN LETRÁN/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	2.4	79.2	1.11	0.9
HG-1	HOSPITAL GENERAL/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	30	6.1	183	1.74	1.2
HG-2	HOSPITAL GENERAL/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	30	7.5	225	2.01	1.52
HG-3	HOSPITAL GENERAL/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	30	7.6	228	1.87	1.12
HG-4	HOSPITAL GENERAL/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	30	8.6	258	1.91	1.4
HG-5	HOSPITAL GENERAL/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	30	9.7	291	1.77	1.17
HG-6	HOSPITAL GENERAL/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	30	9.1	273	1.89	1.55
HG-7	HOSPITAL GENERAL/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	30	7.3	219	1.79	1.63
HG-8	HOSPITAL GENERAL/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	30	9.6	288	1.66	1.31
CH-1	CHILPANCINGO/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	3.5	115.5	1.43	0.63
CH-2	CHILPANCINGO/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	2.5	82.5	1.18	0.61
CH-3	CHILPANCINGO/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	6.5	214.5	1.42	0.73
CH-4	CHILPANCINGO/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	3.1	102.3	1.13	0.68
CH-5	CHILPANCINGO/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	11.8	389.4	1.28	0.97
CH-6	CHILPANCINGO/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	13.3	438.9	1.35	0.97
CH-7	CHILPANCINGO/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	14.1	465.3	1.36	0.87
CH-8	CHILPANCINGO/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	15.7	518.1	1.33	0.85
NV-1	HOSPITAL 20 NOV/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	7.1	234.3	1.27	1.17
NV-2	HOSPITAL 20 NOV/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	7.2	237.6	1.36	1.18
NV-3	HOSPITAL 20 NOV/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	7.7	254.1	1.32	1.03
NV-4	HOSPITAL 20 NOV/TORNIQUETE ENTRADA	SUPERFICIE	33	8.8	290.4	1.29	0.88
NV-5	HOSPITAL 20 NOV/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	8.2	270.6	1.40	0.96
NV-6	HOSPITAL 20 NOV/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	4.8	158.4	1.21	1.06
NV-7	HOSPITAL 20 NOV/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	7.5	247.5	1.29	1.1
NV-8	HOSPITAL 20 NOV/TORNIQUETE SALIDA	SUPERFICIE	33	11.9	392.7	1.32	0.72
SJ-IN	SAN JUAN DE LETRÁN INTERIOR ANDÉN	BIOAEROSO L	90	8.37	753.3	1.54	0.96
SJ-EXT	SAN JUAN DE LETRÁN EXTERIOR	BIOAEROSO L	75	7.41	555.75	1.45	1.04
HG-IN	HOSPITAL GENERAL INTERIOR	BIOAEROSO L	220	6.93	1524.6	1.47	0.93
HG-EXT	HOSPITAL GENERAL EXTERIOR	BIOAEROSO L	220	6.2	1364	1.43	0.89

CH-IN	CHILPANCINGO INTERIOR	BIOAEROSO	160	24.08	3852.8	1.45	0.74
CH-EXT	CHILPANCINGO EXTERIOR	BIOAEROSO	170	14.17	2408.9	1.48	0.87
NV-IN	HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE INTERIOR	BIOAEROSO	80	9.6	768	1.48	1.21
NV-EXT	HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE EXTERIOR	BIOAEROSO	80	15.29	1223.2	1.46	1.19

***NH-1:** Estación Chilpancingo; **NH-2:** Estación San Juan de Letrán; **HO-1:** Estación Hospital General; **HO-2:** Estación Hospital 20 de Noviembre.

ANEXO III

Datos de cuantificación de productos de PCR.

ID*	C (ng/uL)	Masa total (ng)	260/280	260/230	ID*	C (ng/uL)	Masa total (ng)	260/280	260/230
SJ-1	44.87	1794.8	1.80	1.51	CH-5	21.91	876.4	1.68	0.85
SJ-2	20.02	800.8	1.77	1.08	CH-6	28.61	1144.4	1.75	0.95
SJ-3	21.03	841.2	1.66	0.86	CH-7	30.89	1235.6	1.61	0.7
SJ-4	34.26	1370.4	1.70	1	CH-8	39.29	1571.6	1.70	0.91
SJ-5	21.9	876	1.56	0.63	NV-1	25.04	1001.6	1.69	1.12
SJ-6	23.38	935.2	1.57	0.69	NV-2	19.46	778.4	1.65	0.78
SJ-7	20.53	821.2	1.87	1.75	NV-3	28.75	1150	1.61	0.85
SJ-8	18	720	1.73	0.99	NV-4	27.61	1104.4	1.60	0.99
HG-1	22.63	905.2	1.54	0.65	NV-5	23.39	935.6	1.59	0.86
HG-2	22.68	907.2	1.55	0.67	NV-6	17.29	691.6	1.63	0.76
HG-3	39.47	1578.8	1.67	0.67	NV-7	22.14	885.6	1.59	0.77
HG-4	31.04	1241.6	1.59	0.7	NV-8	25.85	1034	1.61	0.85
HG-5	34.91	1396.4	0.69	0.41	SJ-IN	12.42	496.8	1.78	0.72
HG-6	32.07	1282.8	1.63	0.89	SJ-EXT	29.95	1198	1.80	1.16
HG-7	17.67	706.8	1.60	0.66	HG-IN	6.53	261.2	1.80	0.45
HG-8	35.38	1415.2	1.60	0.81	HG-EXT	11.57	462.8	1.79	0.38
CH-1	30.71	1228.4	1.66	0.84	CH-IN	9.63	385.2	1.70	0.15
CH-2	29.31	1172.4	1.67	0.45	CH-EXT	5.66	226.4	1.98	0.07
CH-3	26.46	1058.4	1.64	0.72	NV-IN	5.32	212.8	1.77	0.43
CH-4	27.28	1091.2	1.64	0.7	NV-EXT	7.61	304.4	1.93	0.33

ANEXO IV

Cifras detalladas del procesamiento de las secuencias de genomas de bacterias cultivables.

	Muestra	Datos crudos	Pareadas Trimomatic	No Pareadas Trimomatic	Contigs Spades	Contigs Velvet	No mapeadas	Contigs + no mapeadas >150	Proteínas prodigal
HOSPITAL	# secuencias	4,134,311/ 4,134,311	3,994,772/ 3,994,772	97,454/ 25,150	508,172	282,386	698,302	1,249,230	1,322,801
	long. total (pb)	622,014,508/ 622,424,343	590,484,672/ 588,355,065	12,907,675/ 2,794,081	244,559,683	43,755,873	102,231,552	360,679,680	
	long. mín. (pb)	35/35	36/36	36/36	56	100	42	150	
	long. máx. (pb)	151/151	151/151	151/151	33952	1,415	151	33,952	
	long. prom. (pb)	150.5/150.6	147.8/147.3	132.4/111.1	481.3	155	146.4	288.7	
	Q1	151/150	150/150	133/60	240	131	150	151	
	Q2	151/151	151/151	150/145	293	150	151	151	
	Q3	151/151	151/151	151/150	480	164	151	265	
NO HOSPITAL	# secuencias	712,925/ 712,925	681,289/ 681,289	19,487/5,163	137,425	115,138	269,043	414,342	412,125
	long. total (pb)	105,271,701/ 105,341,898	98,580,985/ 98,480,724	2,432,402/ 556,789	45,284,670	18,006,986	38,513,034	88,779,178	
	long. mín. (pb)	35/35	36/36	36/35	63	100	42	150	
	long. máx. (pb)	151/151	151/151	151/152	574	11,474	151	11,474	
	long. prom. (pb)	147.7/147.8	144.7/144.6	124.8/107.8	329.5	156.4	143.1	214.3	
	Q1	150/150	150/150	102/59	233	133	150	151	
	Q2	151/151	150/150	150/127	263	151	150	151	
	Q3	151/151	151/151	151/150	333	178	151	234	

ANEXO V

Glosario de términos ecológicos.

De acuerdo con **Álvarez, et al. 2004:**

Diversidad Alfa (α): es el número de especies referida a un nivel local y que refleja la coexistencia de las especies en una comunidad.

Diversidad beta (β): es la medida del grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades en una región; refleja la respuesta de los organismos a la heterogeneidad espacial.

Índice de Shannon: asume que todas las especies están representadas en las muestras; indica qué tan uniformes están representadas las especies (en abundancia) teniendo en cuenta todas las especies muestreadas.

Índice de Simpson: muestra la probabilidad de que dos individuos sacados al azar de una muestra correspondan a la misma especie.

10. Referencias.

- Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., ... Kafil, H. S. (2020). *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infection and Drug Resistance*, Vol. 13, pp. 423–434.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S228089>
- Adams, R. I., Miletto, M., Lindow, S. E., Taylor, J. W., y Bruns, T. D. (2014). Airborne bacterial communities in residences: Similarities and differences with fungi. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091283>
- Afshinnekoo, E., Meydan, C., Chowdhury, S., Jaroudi, D., Boyer, C., Bernstein, N., ... Mason, C. E. (2015). Geospatial Resolution of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics. *Cell Systems*, 1(1), 72–87.
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.01.001>
- Ahmed M, Lyass L, Markham PN, Taylor SS, Vázquez-Laslop N, Neyfakh AA. (1995) Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J Bacteriol.* Jul;177(14):3904-10. doi: 10.1128/jb.177.14.3904-3910.
- Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., Mendoza, H., Ospina, M., Umaña, AM., Villareal, H. (2004). Manual De Métodos Para El Desarrollo De Inventarios De Biodiversidad. *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt*, p.22.
- Andini, N., & Nash, K. A. (2006). Intrinsic macrolide resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is inducible. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(7), 2560-2562. <https://doi.org/10.1128/AAC.00264-06>
- Baik, K. S., Seong, C. N., Moon, E. Y., Park, Y. D., Yi, H., y Chun, J. (2006).

- Hymenobacter rigui sp. nov., isolated from wetland freshwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9), 2189–2192.
<https://doi.org/10.1099/ijss.0.64181-0>
- Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O.-M. H., y van Spanning, R. J. M. (1998). Molecular Genetics of the Genus Paracoccus: Metabolically Versatile Bacteria with Bioenergetic Flexibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1046–1078.
<https://doi.org/10.1128/mmb.62.4.1046-1078.1998>
- Belda-Ferre, P., Alcaraz, L. D., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M., y Mira, A. (2012). The oral metagenome in health and disease. *ISME Journal*, 6(1), 46–56. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.85>
- Bengtsson-Palme, J., Larsson, D. J., & Kristiansson, E. (2017). Using metagenomics to investigate human and environmental resistomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2690-2703. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx199>
- Bergogne-Bé, E., Zin, R. É., y Towner, K. J. (1996). Acinetobacter ssp. as nosocomial Pathogens: *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148–165. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172888/pdf/090148.pdf>
- Bernard, K. (2012). The genus Corynebacterium and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 50, pp. 3152–3158.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00796-12>
- Birenzvige, A., Eversole, J., Seaver, M., Francesconi, S., Valdes, E., & Kulaga, H. (2003). Aerosol characteristics in a subway environment. *Aerosol Science and Technology*, 37(3), 210–220.
<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/027868203000941>
- Bolger, A. M., Lohse, M., y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Bradley, P. H., y Pollard, K. S. (2017). Proteobacteria explain significant functional variability in the human gut microbiome. *Microbiome*, 5(1), 1–23.
<https://doi.org/10.1186/s40168-017-0244-z>
- Buczolits, S., Denner, E. B. M., Vybiral, D., Wieser, M., Kämpfer, P., y Busse, H. J. (2002). Classification of three airborne bacteria and proposal of Hymenobacter

- aerophilus sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 445–456. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-445>
- Bushnell, B. (2015). BMAP short-read aligner, and other bioinformatics tools. *University of California, Berkeley, CA*.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 421.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Chase, J., Fouquier, J., Zare, M., Sonderegger, D. L., Knight, R., Kelley, S. T., ... Caporaso, J. G. (2016). Geography and Location Are the Primary Drivers of Office Microbiome Composition. *MSystems*, 1(2), 1–18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00022-16>. Editor
- Citron, D. M., Tyrrell, K. L., y Goldstein, E. J. C. (2012). *Peptoniphilus coxii* sp. nov. and *Peptoniphilus tyrrelliae* sp. nov. isolated from human clinical infections. *Anaerobe*, 18(2), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.11.008>
- Cosseau, C., Romano-Bertrand, S., Duplan, H., Lucas, O., Ingrassia, I., Pigasse, C., ... Jumas-Bilak, E. (2016). Proteobacteria from the human skin microbiota: Species-level diversity and hypotheses. *One Health*, 2, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2016.02.002>
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical infectious diseases*, 42(Supplement_1), S25-S34. <https://doi.org/10.1086/491711>
- Dastager, S. G., Lee, J. C., Ju, Y. J., Park, D. J., y Kim, C. J. (2008). *Rubellimicrobium mesophilum* sp. nov., a mesophilic, pigmented bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(8), 1797–1800. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65590-0>
- Depardieu, F., y Courvalin, P. M. (2017). Glycopeptide-Resistance in Enterococci. In D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, y D. Marchaim (Eds.), *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance, Volume 1* (pp.

- 289–305). https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4_20
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069 LP – 5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., y Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of acinetobacter spp.: An overview. *Microbes and Environments*, 26(2), 101–112. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179>
- Dybwad, M., Granum, P. E., Bruheim, P. P., y Blatnya, J. M. (2012). Characterization of airborne bacteria at an underground subway station. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1917–1929. <https://doi.org/10.1128/AEM.07212-11>
- Eribe, E. R. K., y Olsen, I. (2008). Leptotrichia species in human infections. *Anaerobe*, Vol. 14, pp. 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.04.004>
- Ernst, C. M., Staubitz, P., Mishra, N. N., Yang, S. J., Hornig, G., Kalbacher, H., ... & Peschel, A. (2009). The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS pathogens*, 5(11), e1000660. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000660>
- Fabrega, A., Martin, R. G., Rosner, J. L., Tavio, M. M., & Vila, J. (2010). Constitutive SoxS expression in a fluoroquinolone-resistant strain with a truncated SoxR protein and identification of a new member of the marA-soxS-rob regulon, mdtG. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 1218-1225. <https://doi.org/10.1128/AAC.00944-09>
- Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B. H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., ... Li, H. (2013). Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 2152–2160. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.21>
- Flores, G. E., Bates, S. T., Knights, D., Lauber, C. L., Stombaugh, J., Knight, R., y Fierer, N. (2011). Microbial biogeography of public restroom surfaces. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028132>
- Forsberg KJ, Patel S, Wencewicz TA, Dantas G. (2015) The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Chem Biol*. Jul 23;22(7):888-

97. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.05.017.

- García-Castellanos, R., Mallorquí-Fernández, G., Marrero, A., Potempa, J., Coll, M., & Gomis-Ruth, F. X. (2004). On the transcriptional regulation of methicillin resistance: Mecl repressor in complex with its operator. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17888-17896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313123200>
- Gardete, S., & Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 124(7), 2836-2840. <https://doi.org/10.1172/JCI68834>
- Galperin, M. Y. (2013). Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes Bacterial systematics from Gram stain to 16S rRNA. *Microbiol Spectr.*, 1(2), 1–27. <https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012>
- Gao, X. L., Shao, M. F., Wang, Q., Wang, L. T., Fang, W. Y., Ouyang, F., & Li, J. (2018). Airborne microbial communities in the atmospheric environment of urban hospitals in China. *Journal of hazardous materials*, 349, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.043>
- Giguere, S., Berghaus, L. J., y Willingham-Lane, J. M. (2018). Antimicrobial resistance in *Rhodococcus equi*. *American Society for Microbiology*, 10(4), 633–638. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0004-2016>
- Gilbert, Y., Veillette, M., y Duchaine, C. (2010). Airborne bacteria and antibiotic resistance genes in hospital rooms. *Aerobiologia*, 26(3), 185–194. <https://doi.org/10.1007/s10453-010-9155-1>
- Gohli, J., Bøifot, K. O., Moen, L. V., Pastuszek, P., Skogan, G., Udekwu, K. I., y Dybwad, M. (2019). The subway microbiome: Seasonal dynamics and direct comparison of air and surface bacterial communities. *Microbiome*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0772-9>
- Greene, N. P., Kaplan, E., Crow, A., y Koronakis, V. (2018). Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: A structural and functional perspective. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00950>
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., ... Segre, J. A. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome.

- Science*, 324(5931), 1190–1192. <https://doi.org/10.1126/science.1171700>
- Gudeta, D. D., Moodley, A., Bortolaia, V., y Guardabassi, L. (2014). VanO, a new glycopeptide resistance operon in environmental *Rhodococcus equi* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1768–1770. <https://doi.org/10.1128/AAC.01880-13>
- Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 367–402. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00031-0)
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), 669-685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>
- Hanson, B., Zhou, Y., Bautista, E. J., Urch, B., Speck, M., Silverman, F., ... Sordillo, J. E. (2016). Characterization of the bacterial and fungal microbiome in indoor dust and outdoor air samples: A pilot study. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 18(6), 713–724. <https://doi.org/10.1039/c5em00639b>
- Hernandez-Castillo, O., Castaneda-Briones, M. T., Mugica-Álvarez, V, Murcia,.. y Falcon Briseño, Y, Y. (2014). Aerobiological study in the Mexico City subway system. *Aerobiología*. 357–367. <https://doi.org/10.1007/s10453-014-9334-6>
- Hernández, A. M., Vargas-Robles, D., Alcaraz, L. D., y Peimbert, M. (2020). Station and train surface microbiomes of Mexico City's metro (subway/underground). *BioRxiv*, 735027. <https://doi.org/10.1101/735027>
- Heshiki, Y., Dissanayake, T., Zheng, T., Kang, K., Yueqiong, N., Xu, Z., ... Li, J. (2017). Toward a metagenomic understanding on the bacterial composition and resistome in Hong Kong banknotes. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00632>
- Hooper, D. C., y Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 12–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>
- Hoseini, M., Jabbari, H., Naddafi, K., Nabizadeh, R., Rahbar, M., Yunesian, M., & Jaafari, J. (2012). Concentration and distribution characteristics of airborne fungi in

- indoor and outdoor air of Tehran subway stations. *Aerobiologia*, 29(3), 355-363.
doi: 10.1007/s10453-012-9285-8
- Hospodsky, D., Qian, J., Nazaroff, W. W., Yamamoto, N., Bibby, K., Rismani-Yazdi, H., y Peccia, J. (2012). Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034867>
- Hsu, T., Joice, R., Vallarino, J., Abu-Ali, G., Hartmann, E. M., Shafquat, A., ... Huttenhower, C. (2016). Urban Transit System Microbial Communities Differ by Surface Type and Interaction with Humans and the Environment. *MSystems*, 1(3), 1–18. <https://doi.org/10.1128/msystems.00018-16>
- Hwang, S. H., Park, W. M., Ahn, J. K., Lee, K. J., Min, K. B., y Park, J. B. (2016). Relationship between culturable airborne bacteria concentrations and ventilation systems in underground subway stations in Seoul, South Korea. *Air Quality, Atmosphere and Health*, 9(2), 173–178. <https://doi.org/10.1007/s11869-015-0316-9>
- Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., y Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 119.
- Hynninen, A., Touzé, T., Pitkänen, L., Mengin-Lecreulx, D., & Virta, M. (2009). An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. *Molecular microbiology*, 74(2), 384-394.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06868.x>
- Jonas, B. M., Murray, B. E., & Weinstock, G. M. (2001). Characterization of emeA, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(12), 3574-3579.
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3574-3579.2001>
- Kang, K., Ni, Y., Li, J., Imamovic, L., Sarkar, C., Kobler, M. D., ... Panagiotou, G. (2018). The Environmental Exposures and Inner- and Intercity Traffic Flows of the Metro System May Contribute to the Skin Microbiome and Resistome. *Cell Reports*, 24(5), 1190-1202.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.109>
- Kawasaki, T., Kyotani, T., Ushiogi, T., Izumi, Y., Lee, H., & Hayakawa, T. (2010). Distribution and Identification of Airborne Fungi in Railway Stations in Tokyo, Japan. *Journal Of Occupational Health*, 52(3), 186-193. doi: 10.1539/joh.o9022

- Kim, K. H., Im, W. T., y Lee, S. T. (2008). *Hymenobacter soli* sp. nov., isolated from grass soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 941–945. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64447-0>
- Klimenko, N. S., Tyakht, A. V., Toshchakov, S. V., Shevchenko, M. A., Korzhenkov, A. A., Afshinnikoo, E., ... Alexeev, D. G. (2020). Co-occurrence patterns of bacteria within microbiome of Moscow subway. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.01.007>
- Krisko, A., y Radman, M. (2013). Biology of extreme radiation resistance: The way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), 1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012765>
- Kwon, S., Lee, B., y Yoon, S. (2014). CASPER: context-aware scheme for paired-end reads from high-throughput amplicon sequencing From RECOMB-Seq: Fourth Annual RECOMB Satellite Workshop on Massively Parallel Sequencing. *BMC Bioinformatics*, 15(10), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S9-S10>
- Lax, S., Smith, D. P., Hampton-Marcell, J., Owens, S. M., Handley, K. M., Scott, N. M., ... Gilbert, J. A. (2014). Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science*, 345(6200), 1048–1052. <https://doi.org/10.1126/science.1254529>
- Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. (2011) D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. Oct;55(10):4606-12. doi: 10.1128/AAC.00714-11.
- Leung, M. H. Y., Wilkins, D., Li, E. K. T., Kong, F. K. F., y Lee, P. K. H. (2014). Indoor-air microbiome in an urban subway network: Diversity and dynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6760–6770. <https://doi.org/10.1128/AEM.02244-14>
- Li Kelvin, Bihan Monika , Yooseph Shibu, M. B. (2012). Analyses of the Microbial Diversity across the Human Microbiome. *PloS One*, 7(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/Citation>
- Li, W., y Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658–1659.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>

- Li, Y., Liao, H., y Yao, H. (2019). Prevalence of antibiotic resistance genes in air-conditioning systems in hospitals, farms, and residences. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(5).
<https://doi.org/10.3390/ijerph16050683>
- Lis, D. O., Pacha, J. Z., & Idzik, D. (2009). Methicillin resistance of airborne coagulase-negative staphylococci in homes of persons having contact with a hospital environment. *American journal of infection control*, 37(3), 177-182.
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2008.09.013>
- Luongo, J. C., Barberán, A., Hacker-Cary, R., Morgan, E. E., Miller, S. L., y Fierer, N. (2017). Microbial analyses of airborne dust collected from dormitory rooms predict the sex of occupants. *Indoor Air*, 27(2), 338–344. <https://doi.org/10.1111/ina.12302>
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., ... Ejim, L. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348–3357.
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10), 622-628. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, 8(4).
- Meadow, J. F., Altrichter, A. E., Bateman, A. C., Stenson, J., Brown, G. Z., Green, J. L., y Bohannan, B. J. M. (2015). Humans differ in their personal microbial cloud. *PeerJ*, 2015(9), 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.1258>
- Meadow, J. F., Altrichter, A. E., y Green, J. L. (2014). Mobile phones carry the personal microbiome of their owners. *PeerJ*, 2014(1), 1–14. <https://doi.org/10.7717/peerj.447>
- Million, M., Lagier, J. C., Yahav, D., y Paul, M. (2013). Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 19, pp. 305–313.
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12172>
- Miranda-Novales, M. G., Flores-Moreno, K., López-Vidal, Y., Rodríguez-Álvarez, M., Solórzano-Santos, F., Soto-Hernández, J. L., ... Network, U. (2019). Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in Mexican hospitals. *Salud Pública de México*, 62(1, ene-feb), 42–49.

- Neyfakh AA, Bidnenko VE, Chen LB. (1991) Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 1;88(11):4781-5. doi: 10.1073/pnas.88.11.4781.
- Nishino K, Senda Y, Yamaguchi A. (2008). The AraC-family regulator GadX enhances multidrug resistance in *Escherichia coli* by activating expression of mdtEF multidrug efflux genes. *J Infect Chemother*. Feb;14(1):23-9. doi: 10.1007/s10156-007-0575-y.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., y Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research*, 27(5), 824–834.
- Okada, U., Yamashita, E., Neuberger, A., Morimoto, M., Van Veen, H. W., y Murakami, S. (2017). Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from *Acinetobacter baumannii*. *Nature Communications*, 8(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01399-2>
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Stevens, M. H. H., Oksanen, M. J., y Suggests, M. (2007). The vegan package. *Community Ecology Package*, 10, 631–637.
- Parent, R. O. G. E. R., & Roy, P. H. (1992). The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424: a new breed of cat. *Journal of bacteriology*, 174(9), 2891-2897.
<https://doi.org/10.1128/jb.174.9.2891-2897.1992>
- Pérez, A., Canle, D., Latasa, C., Poza, M., Beceiro, A., del Mar Tomas, M., ... & Bou, G. (2007). Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(9), 3247-3253. <https://doi.org/10.1128/AAC.00072-07>
- Picco, A., y Rodolfi, M. (2000). Airborne fungi as biocontaminants at two Milan underground stations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45(1-2), 43-47. doi: 10.1016/s0964-8305(00)00047-0
- Piddock, L. J. V. (2006). Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol*, 19(2), 382–402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382>
- Poole K. (2005) Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(2):479-87. doi: 10.1128/AAC.49.2.479-487.2005.
- Potron, A., Vuilleminot, J. B., Puja, H., Triponney, P., Bour, M., Valot, B., ... & Plésiat,

- P. (2019). IS Aba1-dependent overexpression of eptA in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(9), 2544-2550. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz241>
- Pruitt, K. D., Tatusova, T., y Maglott, D. R. (2007). NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D61–D65. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl842>
- Prussin II, A. J., y Marr, L. C. (2015). Sources of airborne microorganisms in the built environment. *Microbiome*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0144-z>
- Robertson, C. E., Baumgartner, L. K., Harris, J. K., Peterson, K. L., Stevens, M. J., Frank, D. N., y Pace, N. R. (2013). Culture-independent analysis of aerosol microbiology in a metropolitan subway system. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11), 3485–3493. <https://doi.org/10.1128/AEM.00331-13>
- Santa-Ana-Tellez, Y., Mantel-Teeuwisse, A. K., Dreser, A., Leufkens, H. G. M., y Wirtz, V. J. (2013). Impact of over-the-counter restrictions on antibiotic consumption in Brazil and Mexico. *PloS One*, 8(10).
- Savini, V., Catavitello, C., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., Bianco, A., ... D'Antonio, D. (2010). Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 59, pp. 1395–1402. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.021709-0>
- Schloss, P. D., & Westcott, S. L. (2011). Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3219-3226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02810-10>
- Schmutz, E., Mühlenweg, A., Li, S. M., y Heide, L. (2003). Resistance genes of aminocoumarin producers: Two type II topoisomerase genes confer resistance against coumermycin A1 and clorobiocin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 869–877. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.869-877.2003>
- Serrano-Silva, N., y Calderón-Ezquerro, M. C. (2018). Metagenomic survey of bacterial diversity in the atmosphere of Mexico City using different sampling methods. *Environmental Pollution*, 235, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.035>

- Seino, K., Takano, T., Nakamura, K., & Watanabe, M. (2005). An evidential example of airborne bacteria in a crowded, underground public concourse in Tokyo. *Atmospheric Environment*, 39(2), 337-341. doi: 10.1016/j.atmosenv.2004.09.030
- Sharma, A., Sharma, R., Bhattacharyya, T., Bhandu, T., y Pathania, R. (2017). Fosfomicin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter-AbaF. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(1), 68–74. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw382>
- Shin, N. R., Whon, T. W., y Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, Vol. 33, pp. 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Shin, S. K., Kim, J., Ha, S. M., Oh, H. S., Chun, J., Sohn, J., y Yi, H. (2015). Metagenomic insights into the bioaerosols in the indoor and outdoor environments of childcare facilities. *PLoS ONE*, 10(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126960>
- Thedieck, K., Hain, T., Mohamed, W., Tindall, B. J., Nimtz, M., Chakraborty, T., ... & Jänsch, L. (2006). The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*, 62(5), 1325-1339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05452.x>
- Tietze, E., Tschäpe, H. and Golubev, A.V. (1990), DNA probes for studying streptothricin resistance evolution in enteric bacteria. *J. Basic Microbiol.*, 30: 279-287. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620300413>
- Triadó-Margarit, X., Veillette, M., Duchaine, C., Talbot, M., Amato, F., Minguillón, M. C., ... Moreno, T. (2017). Bioaerosols in the Barcelona subway system. *Indoor Air*, 27(3), 564–575. <https://doi.org/10.1111/ina.12343>
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., y Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750.
- Van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in*

- microbiology, 2, 203. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., y van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495–548. <https://doi.org/10.1128/mubr.00005-07>
- Vila-Costa, M., Gioia, R., Aceña, J., Pérez, S., Casamayor, E. O., y Dachs, J. (2017). Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism. *Water Research*, 115, 309–317.
- Weiss, H., Hertzberg, V. S., Dupont, C., Espinoza, J. L., Levy, S., Nelson, K., y Norris, S. (2019). The Airplane Cabin Microbiome. *Microbial Ecology*, 77(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1191-3>
- Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., y Rüden, H. (1997). Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1394–1397. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1394-1397.1997>
- Weon, H. Y., Kim, B. Y., Schumann, P., Son, J. A., Jang, J., Go, S. J., y Kwon, S. W. (2007). *Deinococcus cellulosilyticus* sp. nov., isolated from air. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 1685–1688. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64951-0>
- Wickham, H. (2011). ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(2), 180–185.
- Wood, D. E., y Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15(3), R46.
- Yan, N. (2013). Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(3), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.003>
- Yang, Y., Itoh, T., Yokobori, S. I., Itahashi, S., Shimada, H., Satoh, K., ... Yamagishi, A. (2009). *Deinococcus aerius* sp. nov., isolated from the high atmosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 1862–1866. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007963-0>
- Yang, Y., Itoh, T., Yokobori, S. I., Shimada, H., Itahashi, S., Satoh, K., ... Yamagishi, A. (2010). *Deinococcus aetherius* sp. nov., isolated from the stratosphere.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(4), 776–779.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.010876-0>

- Yassin, M., y Almouqatea, S. (2010). Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7(3), 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2011.04.021>
- Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, Walsh TR. (2012) Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-β-lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6154-9. doi: 10.1128/AAC.05654-11.
- Zerbino, D. R., y Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18(5), 821–829.
- Zhou, F., y Wang, Y. (2013). Characteristics of antibiotic resistance of airborne *Staphylococcus* isolated from metro stations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(6), 2412–2426.
<https://doi.org/10.3390/ijerph10062412>