



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Historia de un viaje:
dinámica de los genes de
resistencia a antibióticos,
del cuerpo humano al
ecosistema

Lucía Maestre Carballa



Tesis **Doctorales**

UNIVERSIDAD de ALICANTE

Unitat de Digitalització UA

Unidad de Digitalización UA



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

**DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA, GENÉTICA Y
MICROBIOLOGÍA.
FACULTAD DE CIENCIAS**

**HISTORIA DE UN VIAJE: DINÁMICA DE
LOS GENES DE RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS, DEL CUERPO HUMANO
AL ECOSISTEMA**



LUCÍA MAESTRE CARBALLA

**Tesis presentada para aspirar al grado de
DOCTOR/DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD
DE ALICANTE**

**DOCTORADO EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL Y APLICADA**

**Dirigida por:
MANUEL MARTÍNEZ GARCÍA**

Alicante, Julio 2022

Esta tesis ha sido financiada gracias a la ayuda para la realización de contratos destinados a la formación predoctoral en colaboración con empresas (UAIND) con número de referencia I-PI 95-18 en colaboración con el Vicerrectorado de Investigación y Transferencia de Conocimiento de la Universidad de Alicante y el Hospital Universitario del Vinalopó.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

El doctor MANUEL MARTÍNEZ GARCIA

Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Alicante,

CERTIFICA:

Que la memoria de Tesis Doctoral titulada: “Historia de un viaje: dinámica de los genes de resistencia a antibióticos, del cuerpo humano al ecosistema” presentada por LUCÍA MAESTRE CARBALLA, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante. Y para que conste a los efectos oportunos, firma en Alicante __ de ____ del años dos mil veintidós.

Fdo: Manuel Martínez García

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Para mis padres y hermano

Universitat d'Alacant
Para Julio
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

“Imagina saber que eres la única persona en el mundo que va a contemplar un pequeño rincón del cielo por primera vez. A pesar de los dolores de cabeza - gráficos que no ajustan, fórmulas que se resisten, programas que no ejecutan - y el tedio, la burocracia, la precariedad, la soledad, merece la pena”

Eva Villaver, Las mil caras de la Luna.

Lista de abreviaturas

ARG/GRA: *Antibiotic Resistance Gen/ Gen de Resistencia a Antibióticos*

ACoP: Análisis de las Coordenadas Principales

ADN: Ácido dextrirribonucleico

AGS: *Average genome size* (tamaño medio del genoma)

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

C: Celsius

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

ddPCR: *droplet digital PCR*

dPCR: PCR digital

FAO: Organización de las naciones unidas para la Alimentación y agricultura

FISH: Hibridación In Situ Fluorescente

g: Fuerza centrífuga relativa

Gb: Giga pares de bases

h: Horas

HGT/THG: *Horizontal Gen Transference/ Transferencia Horizontal de Genes*

HMP/PMH: *Human Microbiome Project/ Proyecto del Microbioma Humano*

ICTV: *International Comitee on Taxonomy of Viruses*

Kb: Kilo pares de bases

Km: Kilómetros

L: Litros

LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucle

m³: Metros cúbicos

Mb: Mega pares de bases

MDA: Amplificación por desplazamiento múltiple

MDK: *Minimum Duration for Killing*

min: Minutos

mL: Mililitros

MLS: Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas

MR: Multirresistentes

MRB: Bacterias multirresistentes

N: Norte

ng: nanogramos

NTA: *Nano Track Analysis* (Seguimiento de nanopartículas)

OIE: Organización mundial de sanidad animal

ORF: *Opening Reading Frame* (marco abierto de lectura)

pb: Pares de bases

PCA: *Principal Component Analysis* (Análisis de los componentes principales)

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena

pg: Picogramos

PRAN: Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos

PRG: *Polymixin Resistance Genes* (Genes de resistencia a la polimixina)

qPCR: PCR cuantitativa

rRNA: Gen ribosómico

SE: *Standard error* (Error estándar)

TEM: *Transmission Electron Microscopy* (Microscopía de transmisión electrónica)

Vesicle-LP: *Vesicle Like Particles* (Partículas similares a vesículas)

VLP: *Virus Like Particles* (Partículas similares a virus)

W: Oeste

WHO/OMS: *World Health Organization/ Organización Mundial de la Salud*

WWTP: Wastewater Treatment Plant (Depuradora)

Índice

Sección 1- INTRODUCCIÓN, RESUMEN y REFERENCIAS.....	17
Introducción.....	19
Resistencia a los antibióticos: un problema a escala global.....	19
La resistencia a antibióticos a bacterias: una carrera evolutiva por la adaptación.....	20
Clasificación de los antibióticos.....	20
Resistencia a antibióticos: mecanismos y transmisión.....	21
Cómo estudiar las resistencias a antibióticos: metodologías clásicas y otras técnicas.....	23
Identificación de un gen de resistencia a antibióticos entre un “mar” de genes: el uso de bases de datos genéticas.....	25
Resumen de la tesis.....	27
Referencias.....	32
Sección 2- TRABAJOS PUBLICADOS.....	37
Capítulo 1: A Resistome Roadmap: From the Human Body to Pristine Environments.....	39
Capítulo 2: Insights into the antibiotic resistance dissemination in a wastewater effluent microbiome: bacteria, viruses and vesicles matter.....	41
Sección 3- TRABAJOS NO PUBLICADOS.....	43
Capítulo 3: Dinámica de los genes de resistencia a antibióticos en las aguas de la ciudad de Alicante.....	45
Capítulo 4: Explorando el aire como vector abiótico de dispersión de genes de resistencia a antibióticos.....	77
Sección 4- CONCLUSIONES.....	115

SECCIÓN 1: INTRODUCCIÓN, RESUMEN Y REFERENCIAS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Introducción

Resistencia a los antibióticos: un problema a escala global

El uso de antibióticos ha salvado muchas vidas y transformado la medicina. El empleo de éstos por el ser humano data de hace más de dos mil años, existiendo registros sobre civilizaciones antiguas como la griega, egipcia y china donde las heridas se trataban con moho procedente de diferentes alimentos (Gould, 2016). También se han hallado restos del antibiótico tetraciclina en huesos de una población en la Nubia sudanesa datados del 350-550 d.C. Se cree que esta se depositó en los huesos a través de la dieta, más concretamente por la ingesta de cerveza con microorganismos fermentadores productores de antibióticos como *Streptomyces* (Nelson *et al.*, 2010).

Fue el descubrimiento de la penicilina (Fleming, 1929) lo que supuso una revolución en la medicina ya que por primera vez se empleaban los antibióticos en la práctica clínica, es lo que históricamente se conoce como el nacimiento de la era moderna de los antibióticos (Ventola, 2015).

La utilización de los antibióticos junto a mejoras en la nutrición, canalización y tratamiento del agua y la aparición de vacunas han supuesto, además, un aumento de la esperanza de vida en los dos últimos siglos (Rosini *et al.*, 2020). Sin embargo, el continuo uso y abuso de estas sustancias ha llevado a una crisis a nivel global ya que los microorganismos son capaces de adaptarse y volverse resistentes a los antibióticos. Entre las causas de este aumento de la resistencia están la prescripción innecesaria de muchos antibióticos, el sobreuso en ganadería y acuicultura, así como la ausencia del desarrollo de nuevos antibióticos (Ventola, 2015).

De hecho, en 2015 en Europa se calculó que la muerte por microorganismos resistentes a antibióticos ascendía a 25000 muertes anuales (OMS, 2015). Más recientemente se estimó que en el 2019 las muertes atribuidas a bacterias resistentes a antibióticos a nivel global fue de 1,27 millones, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados (Murray *et al.*, 2022). Finalmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que para el año 2050, si no solucionamos este problema, la primera causa de muerte a nivel mundial será por infección de microorganismos resistentes, matando a 10 millones de personas al año (O'Neill, 2016). Sin embargo, estos cálculos han sido cuestionados ya que es difícil de estimar el número de muertes producidas por microorganismos resistentes a antibióticos debido a que habitualmente no se discierne entre muertes provocadas por la infección de bacterias resistentes a antibióticos y muertes producidas por infecciones bacterianas en las que había presencia de una bacteria resistente a antibióticos (Baquero, 2021).

Entre las consecuencias de la resistencia a antimicrobianos están tanto el alto coste de vidas humanas, como el social y económico: produciendo daños en la economía afectando a la obtención de los alimentos, provocando pérdidas en la productividad y un aumento del

gasto en cuidados médicos, pudiendo producir un daño en la economía comparable a la crisis financiera del 2008-2009 (IACG, 2019). A nivel europeo se estima que puede suponer pérdidas de 1500 millones de Euros anuales (OMS, 2015).

Independientemente de la precisión de los datos publicados, la resistencia a antimicrobianos es un problema reconocido al que tenemos que hacer frente. Por ello ha sido declarada por la OMS como una de las 10 principales amenazas para la salud pública a nivel mundial. En un esfuerzo por dar solución a este problema, en el 2015 se estableció un plan de acción mundial sobre la resistencia a antimicrobianos (OMS, 2015), que involucró a Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para tratar de unir esfuerzos y aplicarlo a todos los sectores que lo precisaban. En España, estos esfuerzos dieron lugar al Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (PRAN), basado en 6 líneas estratégicas aplicadas tanto a la salud animal como humana. Estas líneas son la vigilancia del consumo, control de la resistencia a antibióticos, prevención, investigación, formación al personal sanitario y comunicación a la población (Ministerio de Salud Consumo y Bienestar Social, 2019).

La resistencia a antibióticos en bacterias: una carrera evolutiva por la adaptación

Es importante señalar que tanto la producción de antibióticos como la adquisición de resistencia a éstos, son procesos naturales que encontramos tanto en ambientes antropogénicos, habitualmente considerados como puntos calientes de la dispersión de genes de resistencia a antibióticos (Rizzo *et al.*, 2013), como en ambientes prístinos (Bhullar *et al.*, 2012; Van Goethem *et al.*, 2018). Además de ser natural, es un proceso antiguo ya que se ha encontrado evidencia de la presencia de genes de resistencia a antibióticos en muestras datadas en miles y millones de años en diferentes ambientes (Dcosta *et al.*, 2011; Bhullar *et al.*, 2012).

Clasificación de los antibióticos

La producción de antibióticos (sustancias químicas) por parte de microorganismos se produce para inhibir (parcial o totalmente) o bien matar a otros organismos que puedan competir por los mismos recursos o espacio (Hibbing *et al.*, 2010). Los antibióticos atienden a diferentes clasificaciones, en función de su mecanismo de acción, afectando a la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas, a la pared celular, a la membrana celular y a vías metabólicas (Wright, 2010). Los antibióticos también pueden clasificarse por su espectro de acción (de reducido a amplio), además de por su acción antimicrobiana, en la que si mata a la bacteria tiene efecto bacteriolítico, pero si sólo detiene su crecimiento, se conoce como bacteriostático. Más habitualmente, se clasifican y agrupan en función de su

estructura química (beta-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas...; Tabla 1) (Zurenko *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2002; Meena and Kanwar, 2015; Reygaert, 2018).

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos más comunes.

Mecanismo de Acción		Estructura química	Acción antimicrobiana
Inhibición de la síntesis de la pared celular		Beta-lactámicos Glucopéptidos	Bacteriolítico
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos		(Fluoro)quinolonas	
Despolarización de la membrana celular		Lipopéptidos	
Inhibición de la síntesis proteica	Se unen a la subunidad ribosómica 30 S	Aminoglucósidos	Bacteriostático
		Tetraciclinas	
	Se unen a la subunidad ribosómica 50 S	Oxazolidinonas Estreptograminas	Ambos ¹
		Fenicoles Lincosamidas Macrólidos	Bacteriostático
Inhibición de vías metabólicas		Sulfonamidas Trimetoprima	

¹ Oxazolidinonas: Descrito in vitro como bacteriostático, pero con actividad bacteriolítica in vivo (Zurenko *et al.*, 2001). Estreptograminas: Formado por dos unidades, por separado son bacteriolíticas, unidas bacteriostáticas (Johnston *et al.*, 2002).

Resistencia a antibióticos: mecanismos y transmisión.

La resistencia a antibióticos es una respuesta evolutiva a la presión que supone la exposición a antibióticos (Wright, 2010). Cuando una bacteria es resistente a un antibiótico independientemente del tiempo de exposición y es capaz de transmitir esa capacidad a la siguiente generación hablamos de resistencia, sin embargo, cuando es el estado celular (ej. durmiente) el que determina que la célula no sea afectada por un antibiótico hablamos de persistencia. Habitualmente son persistentes dentro de una población clonal bacteriana una pequeña subpoblación (<1%), lo que aseguraría la supervivencia de estas bacterias ante la exposición a un antibiótico una vez este haya desaparecido (Reygaert, 2018). Una tercera estrategia frente a los antibióticos es la tolerancia, definida como la capacidad de una población bacteriana de sobrevivir a una exposición transitoria de antibióticos bactericidas. Esta puede ser tanto hereditaria como no serlo. La tolerancia implica un crecimiento lento o alargamiento de la fase de adaptación (previa a la fase exponencial de crecimiento) a nivel general de la población bacteriana (Brauner *et al.*, 2016). La diferencia

entre persistencia y tolerancia se establece a nivel clínico midiendo la concentración mínima del antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de un microorganismo (Concentración Mínima Inhibitoria; CMI) y la duración mínima para matar (*MDK* por sus siglas en inglés), es decir, el tiempo mínimo necesario para que el antibiótico mate a un porcentaje dado de la población bacteriana. Esta diferenciación se emplea para proporcionar mejores tratamientos (Brauner *et al.*, 2016).

Existen diversos mecanismos de resistencia a antibióticos: los relacionados con la diana del antibiótico (modificación, remplazo o bien protección de ésta), la inactivación del antibiótico, bombas de flujo para la expulsión de éste, disminución de la permeabilidad al antibiótico o resistencia por ausencia de un gen (habitualmente de porinas, que mediarían la entrada del antibiótico a la célula) (Jia *et al.*, 2017).

La resistencia a antibióticos puede clasificarse en i) intrínseca, ii) fenotípica o iii) adquirida (Olivares *et al.*, 2013). Se conoce como i) resistencia intrínseca aquella presente en el genoma bacteriano sin necesidad de exposición a un antibiótico, serían, por ejemplo, las bombas de flujo (Reygaert, 2018). La resistencia fenotípica ii), en cambio, no es hereditaria y viene determinada por el estado celular (Iskandar *et al.*, 2022), en este grupo se incluyen las células persistentes, la formación de biofilms (estructuras altamente resistentes compuestas por bacterias y matriz extracelular (Yan and Bassler, 2019)) o el *swarming* (desplazamiento de las células) (Butler *et al.*, 2010).

Hablamos de iii) resistencia adquirida cuando se obtiene resistencia a partir de una mutación o por la incorporación de ADN exógeno que contiene un gen que da resistencia (conocido como gen de resistencia a antibióticos o GRA). Cuando se adquiere resistencia por mutación, los mecanismos más habituales para obtenerla son: 1) modificación de la diana del antibiótico (este no se puede unir), 2) disminución de la entrada de antibiótico en la célula, 3) activación de bombas de flujo que expulsan el antibiótico fuera, 4) alteración de vías metabólicas (Munita and Arias, 2016).

La obtención de resistencia a partir de ADN exógeno es mediante el mecanismo conocido como Transferencia Horizontal de Genes (THG), en el que teóricamente cualquier tipo de gen podría transmitirse. Tradicionalmente se describen tres tipos de THG: la conjugación, la transformación y la transducción (Arnold *et al.*, 2021).

La transformación supone la adquisición por parte de una bacteria competente de ADN libre y es llevado a cabo por un 1% de las especies bacterianas descritas (Thomas and Nielsen, 2005). La transducción está mediada por virus de bacterias (bacteriófagos) y la conjugación, dada a partir del contacto célula-célula a través de unas estructuras llamadas pili. La transducción puede darse entre diferentes especies bacterianas (Dahlberg *et al.*, 1998) e incluso entre reinos diferentes (Heinemann and Sprague, 1989). A estos métodos tradicionales se le suman otros conocidos como no canónicos (Arnold *et al.*, 2021), que pueden estar mediados por nanotubos (Dubey and Ben-Yehuda, 2011), vesículas (Bitto *et al.*, 2017) o agentes de transferencia de genes similares a bacteriófagos (Lang *et al.*, 2012).

Una vez el ADN es transferido a la bacteria huésped, este tendrá tres posibilidades: a) ser eliminado por las enzimas de restricción de la célula, b) replicarse, pero únicamente cuando tiene un origen de replicación (plásmidos y virus) o c) recombinarse con el genoma del huésped, donde quedaría integrado (Thomas and Nielsen, 2005).

Cómo estudiar las resistencias a antibióticos: metodologías clásicas y otras técnicas

Las primeras técnicas clásicas para el estudio de resistencia a antibióticos estaban basadas en el cultivo bacteriano, en la que se estimaba si las bacterias podían crecer o no a determinadas concentraciones de antibióticos añadidos al medio de cultivo. En la actualidad se continúan empleando en clínica, ya que son ensayos relativamente baratos y estandarizados (especialmente los automatizados) que ayudan a elegir el tratamiento adecuado (Reller *et al.*, 2009).

En clínica la susceptibilidad a un agente antimicrobiano se mide por la concentración mínima inhibitoria (CMI) que es la concentración mínima de agente antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento del organismo que se testea (Reller *et al.*, 2009). Para la detección de resistencias en clínica se emplean dos metodologías básicas: la difusión, en la que el microorganismo se siembra en placa y se expone a diferentes antibióticos (o concentraciones de éstos) y la dilución, que determina el crecimiento de un microorganismo al que se expone a concentraciones crecientes del antibiótico (Cantón *et al.*, 2000).

Las técnicas para la detección de organismos resistentes a antibióticos basadas en el crecimiento pueden ir también asociadas a otras metodologías para la detección de GRA u organismos resistentes como son espectrometría de masas (MALDI-TOF), citometría de flujo, o hibridación in situ fluorescente (FISH) entre otras (March-Rosselló, 2017).

No obstante, las metodologías basadas en cultivo se enfrentan a la limitación de que no todos los microorganismos presentes en una muestra pueden crecer en un medio de cultivo dado (conocido como el problema de la gran anomalía de recuento en placa) (Staley and Konopka, 1985), lo que sesga los resultados. La dificultad de reproducir en un medio de cultivo artificial las características de un medio natural (nutrientes, pH, temperatura, interdependencia de especies) hace que únicamente puedan cultivarse entre el 0,01 y el 1% de los microorganismos presentes en la muestra (Garza and Dutilh, 2015). Este problema adquiere más importancia en muestras complejas, como las aguas residuales, donde hay una alta diversidad bacteriana que no puede ser representada en su totalidad empleando técnicas de cultivo.

Para evitar esta problemática se recurre a metodologías no basadas en cultivo, las cuales, pueden dar información sobre los genes o microorganismos presentes en la muestra. Para ello, se pueden emplear distintas aproximaciones:

1) Detección de proteínas

En clínica se emplea la inmunocromatografía, con antígenos que detectan la presencia de las proteínas que codifican ciertos GRA de interés, por ejemplo enzimas que destruyen los β -lactámicos como *OXA-48*, *NDM* y *KPC* (Mediavilla-Gradolph *et al.*, 2017).

2) Detección de ácidos nucleicos

Para la detección de GRA se pueden emplear chips de ADN o *microarrays*, basados en la detección de la secuencia de un gen de interés cuando este hibrida con un cebador específico unido a una superficie sólida. Estos *microarrays* pueden detectar y cuantificar desde uno a múltiples GRA (Perreten *et al.*, 2005).

También se emplean metodologías basadas en la PCR (*Polymerase Chain Reaction* por sus siglas en inglés), que amplifican el gen de interés (es decir, realizan copias) mediante el empleo de dos secuencias cortas (cebadores) que permiten que la polimerasa haga copias del gen diana siempre que esté presente en la muestra. Recientemente, se ha empleado la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para identificar GRA de interés de manera rápida e incluso más económica que la PCR (Rivoarilala *et al.*, 2021).

Un paso más allá de la detección de un GRA es la cuantificación de éste. Existen diversas variantes de la PCR que permiten la cuantificación del gen de interés, por ejemplo está la qPCR (PCR cuantitativa), que se encuentra un poco limitada si la concentración del gen de interés es baja y la dPCR (PCR digital), que calcula la abundancia absoluta para un determinado fragmento genómico en una muestra dada sin la necesidad de emplear una curva de calibrado como en la qPCR (Cavé *et al.*, 2016).

Las anteriores técnicas moleculares mencionadas que emplean cebadores que hibridan con la secuencia diana del GRA de estudio están limitadas a la identificación de un número de GRA cuya secuencia debe ser previamente conocida y descrita. Sin embargo, la metagenómica puede identificar masivamente múltiples GRA presentes en una muestra y proporcionar información sobre la distribución, diversidad y origen de los GRA empleando bases de datos de secuencias de DNA de GRA conocidos y la información genética extraída directamente de los microorganismos de la muestra sin necesidad de cultivarla (de Abreu *et al.*, 2021). Esta metodología ha sido ampliamente empleada para el estudio del resistoma (conjunto de genes de resistencia a antibióticos de una muestra) en diferentes ambientes como el microbioma humano (Li *et al.*, 2021), aire (Becsei *et al.*, 2021), agua (Guo *et al.*, 2021) o incluso suelo (Qian *et al.*, 2021).

En la metagenómica, el primer paso es la extracción de DNA de la muestra y posterior secuenciación de DNA. En la actualidad la metodología de secuenciación más empleada es la secuenciación Illumina, que da lugar a lecturas (o fragmentos de secuencias) cortas que

deben procesarse y ensamblarse informáticamente para su posterior análisis. Existen otras tecnologías más novedosas de secuenciación que generan fragmentos o secuencias muy largas de varias kb (Kilobases), como las plataformas de secuenciación Pacific Biosciences (PacBio) (Rhoads and Au, 2015) y Oxford nanopore (Madoui *et al.*, 2015) que parecen prometer grandes avances en el campo de la secuenciación por ser capaces de proporcionar secuencias muy largas que facilitan el ensamblaje de genomas enteros sin necesidad de un elevado cálculo bioinformático (Schadt *et al.*, 2010).

Identificación de un gen de resistencia a antibióticos entre un “mar” de genes: el uso de bases de datos genéticas.

La aparición de las tecnologías de secuenciación como Illumina ha supuesto una revolución en el conocimiento de los ecosistemas y los genes que lo constituyen. Las lecturas obtenidas (en inglés *reads*) son fragmentos de ADN de pequeño tamaño que mediante procesos informáticos podemos unir (o ensamblar) para dar lugar a *contigs* o fragmentos genómicos de mayor tamaño. A partir de éstos podemos obtener proteínas con programas como Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010) que predice los marcos abiertos de lectura y traduce estos a proteínas.

Ante tanta información con multitud de genes de diferente tipo en un mismo ambiente, la identificación de genes de resistencia puede hacerse empleando diferentes metodologías, y una de la más importantes es la comparación bioinformática de las secuencias de los genes recuperados e identificados en una muestra contra bases de datos que contienen las secuencias primarias de GRA. Actualmente se dispone de las siguientes bases de datos de referencia de GRA: CARD (Alcock *et al.*, 2020), RESFAMS (Gibson *et al.*, 2015) BacMet (Pal *et al.*, 2014) y ARG_ANNOT (Gupta *et al.*, 2014). Estas bases de datos contienen secuencias de GRA que han sido exhaustivamente revisadas y comprobadas experimentalmente y que confieren resistencia a antibióticos. Así pues, comparamos las secuencias recuperadas por metagenómica de una muestra, bien ensambladas en fragmentos más largos o sin ensamblar (secuencias en crudo) tanto a nivel de nucleótidos como aminoácidos (proteínas) contra estas bases de datos. Para esta comparación se pueden emplear diferentes programas como BLAST (NCBI) o algoritmos de aprendizaje profundo (Arango-Argoty *et al.*, 2018).

Cuando comparamos nuestros genes con el de alguna base de datos, se debe establecer un umbral de similitud a partir del cual consideramos que el gen encontrado es de resistencia. Si se escoge un umbral laxo, podrían incluirse falsos positivos, mientras que si es muy estricto podrían no considerarse GRA que verdaderamente lo son (falsos negativos). Se ha sugerido que para lecturas cortas, un *bit-score* mayor o igual de 70 minimiza los falsos positivos (Enault *et al.*, 2017). Entre otros estadísticos que indican la similitud de la secuencia problema y la base de datos al compararlas, el *bit-score* mide esta similitud

independientemente del tamaño de la secuencia problema y de la base de datos, lo que permite comparar los alineamientos de una secuencia problema con bases de datos diferentes, sabiendo que el mejor emparejamiento es aquel que tenga un *bit-score* más alto.

Como se ha visto encontramos GRA en la naturaleza de manera frecuente y en diversos lugares, sin embargo, no todos los GRA se consideran igual de peligrosos para el ser humano. Por esa razón recientemente se estableció una agrupación de GRA por rangos de riesgo (Zhang *et al.*, 2021) basados en la lista de la OMS (OMS, 2019), que clasifica en categorías los GRA más dañinos para el ser humano, ayudando a centrar los esfuerzos de contención y haciendo abaricable la acción contra el incremento de las resistencias a antibióticos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Resumen de la Tesis

Indudablemente, la resistencia a antimicrobianos es un problema a escala global que ha sido reconocido como una de las 10 principales amenazas para la salud pública mundial por parte de la OMS (OMS, 2015). Dada su gran importancia, el análisis de los genes de resistencia a antibióticos, pasa a tener un papel crucial para el desarrollo de estrategias que reduzcan la resistencia a antimicrobianos existente.

Sabemos de la presencia de GRA en diferentes ambientes (Bhullar et al., 2012; Rizzo et al., 2013; Van Goethem et al., 2018), pero para centrar esfuerzos en esta tesis se analizan puntos calientes y posibles vías de dispersión de GRA como son el aire y el agua. Para ello se aplicará principalmente la metagenómica, una de las metodologías no basadas en cultivo que mayor información puede dar sobre una muestra dada.

Los puntos calientes de GRA analizados en este trabajo son el ser humano (capítulo 1), aguas de depuradora y otras aguas relevantes (capítulos 2 y 3) y el aire de hospitales y depuradoras (capítulo 4), este último medio, a pesar de su importancia en la dispersión de GRA ha sido menos explorado por sus dificultades técnicas y falta de estandarización. Además de puntos calientes de dispersión de GRA, también analizamos la dispersión desde éstos a ambientes prístinos, en los que la influencia del hombre es inexistente o escasa.

Este trabajo de doctorado puede dividirse en 4 capítulos, dos publicados y otros dos en preparación:

- **A resistome roadmap: from the human body to pristine environments** (Publicado).
- **Insights into the antibiotic resistance dissemination in a wastewater effluent microbiome: bacteria, viruses and vesicles matter** (Publicado).
- **Dinámica de los genes de resistencia a antibióticos en las aguas de la ciudad de Alicante** (En preparación).
- **Explorando el aire como vector abiótico de dispersión de genes de resistencia a antibióticos** (En preparación).

El orden de los capítulos sigue la estructura fijada por la Universidad de Alicante para la publicación de esta tesis por compendio de publicaciones, que consiste en una sección con todos los artículos publicados y otra con los no publicados. Para una lectura más lineal recomendamos empezar por el capítulo 1, luego el 3, posteriormente el capítulo 2 y finalmente el 4.

El resumen de los capítulos está a continuación:

A resistome roadmap: from the human body to pristine environments

(Publicado)

En este trabajo se analizó el resistoma (conjunto de genes de resistencia a antibióticos) de 771 muestras humanas procedentes de 5 partes del cuerpo: piel, fosas nasales, vagina, cavidad oral y aparato digestivo obtenidas del Proyecto del Microbioma Humano (Huttenhower *et al.*, 2012). Para ello se emplearon herramientas bioinformáticas que nos permitieron analizar proteínas del microbioma humano ($9,1 \times 10^7$), identificando un total de 28714 GRA que pertenecieron a 235 tipos distintos de GRA. La mayoría de estos fueron considerados como GRA de bajo riesgo para la salud humana según recientes criterios de la OMS, aunque se localizaron algunos considerados como de alto riesgo como *BlaZ*, *dfrA14*, *dfrA17* y *tetM*. La mayor abundancia de GRA se dio en las fosas nasales, mientras que la menor fue encontrada en el aparato digestivo, curiosamente, la mayor riqueza de GRA estuvo tanto en el aparato digestivo como en las fosas nasales. Los GRA más abundantes en el cuerpo otorgan resistencia a fluoroquinolonas, seguidos por el grupo de los Macrólidos-Lincosamida-Estreptograminas (*MLS* en inglés) o tetraciclinas. La mayoría de GRA pertenecieron a bacterias comensales y se detectó la presencia de multirresistentes sobre todo en la vagina y fosas nasales.

La dispersión de estos GRA encontrados en el Proyecto del Microbioma Humano fue analizada para determinar su llegada a ambientes prístinos (no alterados por el ser humano). Afortunadamente, tras analizar los datos de ambientes prístinos (271 muestras de ambientes prístinos, 77 Gb secuenciados y $2,1 \times 10^8$ proteínas) parece muy poco probable que se seleccionen GRA provenientes del ser humano en estos ambientes (sólo encontramos 1 ejemplo en una bacteria autóctona).

En este trabajo se muestra un análisis del resistoma del ser humano en su conjunto, facilitando la comparación de los datos obtenidos entre partes del cuerpo humano ya que todas las muestras fueron analizadas empleando la misma metodología. Además, otorga un dato esperanzador ya que parece que la transmisión y selección de GRA de origen humano en ambientes prístinos es poco probable.

Insights into the antibiotic resistance dissemination in a wastewater effluent microbiome: bacteria, viruses and vesicles matter

(Publicado)

Este trabajo se centra en el estudio de la potencial dispersión de GRA en un punto caliente que es el efluente del agua tratada de una depuradora de referencia de la ciudad de Alicante, poniendo el foco en métodos de transferencia génica horizontal habitualmente no considerados en otros artículos como son los virus y las vesículas. Para ello se cogieron dos muestras de agua depurada y una se trató con el antibiótico polimixina B, mientras que la otra no se trató (control). Para ambas se estudiaron dos fracciones, la procariota ($\geq 0,2\mu\text{m}$) y la filtrada por $0,2\mu\text{m}$ (compuesta por virus y vesículas). Las muestras y réplicas fueron analizadas empleando metagenómica, citometría, microscopía, fluorometría y seguimiento de nanopartículas.

Los análisis metagenómicos tanto para los datos ensamblados como no ensamblados mostraron que los GRA fueron bastante abundantes en la fracción procariota, pero poco abundantes en la fracción de virus y vesículas.

La comparación entre la muestra tratada y la no tratada reveló que la adición de polimixina aumentó la producción de vesículas, que podrían haber sido utilizadas para reducir la concentración efectiva del antibiótico. A pesar de que la presencia de genes de resistencia a la polimixina en el microbioma fue escasa (0,018% del total de GRA) en la fracción vírica y de vesículas, los GR a la polimixina fueron más abundantes (0,5-0,8%). Nuestros datos sugieren que las vesículas podrían tener un rol activo en la transmisión de GRA ya que los GRA encontrados en la fracción filtrada por $0,2\mu\text{m}$ carecían de genes víricos y parecían tener un origen bacteriano.

Dinámica de los genes de resistencia a antibióticos en las aguas de la ciudad de Alicante

(En Preparación)

Las aguas, además de ser ecosistemas indispensables para la vida, son también una vía de dispersión de bacterias y virus y, por tanto, de posible propagación de GRA. En este capítulo se analizó la dinámica de los GRA en las aguas de Alicante, tanto para la fracción procariota como vírica, en aguas por potabilizar (canal de Crevillente), aguas residuales (hospital y entrada de la depuradora), agua depurada (salida de la depuradora) y en el mar, en un punto cercano a la desembocadura de la depuradora. Los GRA presentes en las muestras fueron analizados mediante metagenómica y dPCR. En total se analizaron 104 Gb, que mostraron cómo la abundancia y riqueza de GRA en aguas de hospital fue superior a las otras muestras analizadas, siendo la menor abundancia y la riqueza encontradas en el agua de mar y canal de Crevillente que abastece a la ciudad de Alicante. Se observa también el efecto “reductor” de la depuradora que, tras procesar las aguas residuales, disminuye en número y abundancia los GRA, cuyo número vuelve a decrecer cuando se analiza la muestra de mar obtenida de un punto cercano a la desembocadura de la depuradora. Entre los GRA más abundantes fueron aquellos que otorgan resistencia a multi-antibióticos, seguidos por β -lactámicos, MLS, nitroimidazol o tetraciclinas. Entre los GRA comunes a todas las muestras encontramos *vanY* clasificado como de alto riesgo por su alto potencial en la contribución a que las bacterias sean multirresistentes.

Los genes *sul2* (resistencia frente a sulfonamidas) y *tetW* (resistencia frente a tetraciclina), estuvieron presentes en todas las muestras procariotas analizadas (datos no ensamblados) por lo que fueron seleccionados para el estudio de su abundancia por dPCR. Ambos GRA fueron más abundantes en el agua de la entrada de la depuradora (11271 copias de *sul2*/ng de DNA que, extrapolando, da una estimación de 4×10^9 copias de *sul2*/L de muestra y 18662 copias de *tetW*/ng de DNA o 7×10^{10} copias de *tetW* /L de agua de depuradora) y menos en el agua de mar (21 copias de *sul2*/ng DNA y 7 copias de *tetW*/ng DNA). Al comparar la cuantificación de la dPCR con la realizada por metagenómica para estos GRA vemos que ambas metodologías coinciden señalando que la muestra de agua de mar es la que menos copias de ambos genes tiene, siendo la segunda con menor cantidad la salida del agua de depuradora. Sin embargo, en el orden de abundancia entre la entrada de la depuradora y el hospital ambas difieren. No se pudo encontrar una relación estadísticamente significativa para los resultados de ambas técnicas. Además, se estudió la presencia de GRA en fragmentos genómicos o *contigs* víricos de ARN y ADN presentes en la entrada y salida de la depuradora. No encontramos ningún GRA en los *contigs* víricos de ARN, mientras, aunque poco frecuentemente, sí los encontramos codificados en virus de ADN.

Explorando el aire como vector abiótico de dispersión de genes de resistencia a antibióticos.

(En Preparación)

El aire puede actuar como vector de dispersión transportando diferentes partículas, tanto inorgánicas como orgánicas, largas distancias. Un ejemplo de elementos orgánicos transportados por el aire son las bacterias que pueden tener en su genoma codificado algún gen de resistencia a antibiótico que, por tanto, también será dispersado.

Este capítulo analiza el resistoma (conjunto de genes de resistencia a antibiótico) del aire de puntos calientes de dispersión de la ciudad de Alicante. Para muestrear se empleó el muestreador ciclónico Coriolis μ y se obtuvieron muestras de aire del hospital (terracea y recepción) y de la depuradora (*in situ*, a favor y en contra de viento). Ante la baja cantidad de ADN obtenida se emplearon diferentes técnicas para secuenciar las muestras. Además de estudiar la fracción procariota de todas las muestras obtenidas, en dos se analizó también la fracción filtrada por 0,2 μm .

El estudio del resistoma se realizó empleando metagenómica aplicada tanto a los datos no ensamblados como a los ensamblados. Los datos no ensamblados mostraron la presencia de GRA en todas las muestras analizadas menos en la de virus del aire de la terracea del hospital. La abundancia de GRA fue superior en conocidos puntos calientes de dispersión como la depuradora *in situ* y la recepción del hospital, que a su vez presentó la mayor riqueza de GRA de todas las muestras analizadas. Los GRA que dan resistencia frente a múltiples antibióticos y aquellos que dan resistencia frente a beta-lactámicos fueron los más abundantes en el aire de Alicante. En el análisis taxonómico del aire se encontró la presencia de bacterias, virus, hongos y eucariotas (ser humano, plantas e insectos especialmente).

El análisis de la parte ensamblada permitió identificar las especies portadoras de GRA, las cuales variaron en función de la muestra analizada. Aunque en su mayoría fueron especies bacterianas, también se encontraron GRA en *contigs* clasificados como fúngicos y en un único *contig* vírico.

En nuestro caso detectamos el transporte de algunos genes de resistencia a antibióticos entre la depuradora *in situ* y a favor de viento (entre un 10 y un 36% de los GRA a favor de viento vienen del aire *in situ*).

Referencias

- de Abreu, V.A.C., Perdigão, J., and Almeida, S. (2021) Metagenomic Approaches to Analyze Antimicrobial Resistance: An Overview. *Front Genet* **11**: 575592.
- Alcock, B.P., Raphenya, A.R., Lau, T.T.Y., Tsang, K.K., Bouchard, M., Edalatmand, A., et al. (2020) CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* **48**: D517–D525.
- Arango-Argoty, G., Garner, E., Pruden, A., Heath, L.S., Vikesland, P., and Zhang, L. (2018) DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome* **6**: 23.
- Arnold, B.J., Huang, I.T., and Hanage, W.P. (2021) Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **20**: 206–218.
- Baquero, F. (2021) Threats of antibiotic resistance: an obliged reappraisal. *Int Microbiol* **24**: 499–506.
- Bautista, R. (2010) Las tres generaciones de la secuenciación. *Encuentros en la Biol* **3**:
- Becsei, Á., Solymosi, N., Csabai, I., and Magyar, D. (2021) Detection of antimicrobial resistance genes in urban air. *Microbiologyopen* **10**:
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., et al. (2012) Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS One* **7**: e34953.
- Bitto, N.J., Chapman, R., Pidot, S., Costin, A., Lo, C., Choi, J., et al. (2017) Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci Rep* **7**: 7072.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N.Q. (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment.
- Butler, M.T., Wang, Q., and Harshey, R.M. (2010) Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 3776–3781.
- Cantón, R., García Sánchez, J.E., Gómez-Lus, M.L., Martínez Martínez, Luis Rodríguez-Avial, C., Vila, J., and García Rodríguez, J.A. (2000) Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los microorganismos. In *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. pp. 1–54.
- Cavé, L., Brothier, E., Abrouk, D., Bouda, P.S., Hien, E., and Nazaret, S. (2016) Efficiency and sensitivity of the digital droplet PCR for the quantification of antibiotic resistance genes in soils and organic residues. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 10597–10608.
- Dahlberg, C., Bergström, M., Andreasen, M., Christensen, B.B., Molin, S., and Hermansson, M. (1998) Interspecies Bacterial Conjugation by Plasmids from Marine Environments Visualized by *gfp* Expression. *Mol Biol Evol* **15**: 385–390.
- Dcosta, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., et al. (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nat* **477**: 457–461.
- Dubey, G.P. and Ben-Yehuda, S. (2011) Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* **144**: 590–600.
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B., and Petit, M.-A. (2017) Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J* **11**: 237–247.

- Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. *Br J Exp Pathol* **10**: 226–236.
- Garza, D.R. and Dutilh, B.E. (2015) From cultured to uncultured genome sequences: Metagenomics and modeling microbial ecosystems. *Cell Mol Life Sci* **72**: 4287–4308.
- Gibson, M.K., Forsberg, K.J., and Dantas, G. (2015) Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J* **9**: 207–16.
- Van Goethem, M.W., Pierneef, R., Bezuidt, O.K.I., Van De Peer, Y., Cowan, D.A., and Makhalanyaane, T.P. (2018) A reservoir of “historical” antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome* **6**: 40.
- Gould, K. (2016) Antibiotics: from prehistory to the present day. *J Antimicrob Chemother* **71**: 572–575.
- Guo, X., Tang, N., Lei, H., Fang, Q., Liu, L., Zhou, Q., and Song, C. (2021) Metagenomic Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Untreated Wastewater From Three Different Hospitals. *Front Microbiol* **12**: 2457.
- Gupta, S.K., Padmanabhan, B.R., Diene, S.M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., and Rolain, J.-M. (2014) ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 212–220.
- Heather, J.M. and Chain, B. (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**: 1–8.
- Heinemann, J.A. and Sprague, G.F. (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nat* **1989 3406230 340**: 205–209.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., and Peterson, S.B. (2010) Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* **8**: 15–25.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J.H., Chinwalla, A.T., et al. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**: 207–214.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W., and Hauser, L.J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**: 119.
- IACG (2019) No time to wait: securing the future from drug-resistant infections report to the secretary-general of the united nations.
- Iskandar, K., Murugaiyan, J., Halat, D.H., Hage, S. El, Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., et al. (2022) Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiotics* **11**.
- Jauk, F. (2019) Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones Next-Generation Sequencing (NGS): basic concepts and applications. *HEMATOLOGÍA* **23**: 21–38.
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., et al. (2017) CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* **45**: D566–D573.
- Johnston, N., Mukhtar, T., and Wright, G. (2002) Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Curr Drug Targets* **3**: 335–344.
- Lang, A.S., Zhaxybayeva, O., and Beatty, J.T. (2012) Gene transfer agents: phage-like elements of

genetic exchange. *Nat Rev Microbiol* 2012 107 **10**: 472–482.

Li, Z., Xia, J., Jiang, L., Tan, Y., An, Y., Zhu, X., et al. (2021) Characterization of the human skin resistome and identification of two microbiota cutotypes. *Microbiome* **9**: 47.

Madoui, M.A., Engelen, S., Cruaud, C., Belser, C., Bertrand, L., Alberti, A., et al. (2015) Genome assembly using Nanopore-guided long and error-free DNA reads. *BMC Genomics* **16**: 1–11.

March-Rosselló, G.A. (2017) Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed)* **35**: 182–188.

Mediavilla-Gradolph, C., Sáinz-Rodríguez, R., Valverde-Troya, M., de Toro-Peinado, I., Bermudez-Ruíz, M.P., and Palop-Borrás, B. (2017) Evaluation of an immunochromatographic test for the detection of OXA-48 carbapenemase. *Rev Esp Quimioter* **30**: 45–49.

Meena, K.R. and Kanwar, S.S. (2015) Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *Biomed Res Int* **2015**:

Ministerio de Salud Consumo y Bienestar Social, G. de E. (2019) Plan Nacional Frente a la Resistencia a los Antibióticos 2019-2021, Madrid.

Munita, J.M. and Arias, C.A. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* **4**: 464–472.

Murray, C.J., Shunji Ikuta, K., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., et al. (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis.

Nelson, M.L., Dinardo, A., Hochberg, J., and Armelagos, G.J. (2010) Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. *Am J Phys Anthropol* **143**: 151–154.

O'Neill, J. (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, United Kingdom.

Olivares, J., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., Sanchez, M.B., and Martinez, J.L. (2013) The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol* **4**:

OMS (2015) 2019 antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, Geneva.

OMS (2019) 2019 Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline.

Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Rensing, C., Kristiansson, E., and Larsson, D.G.J. (2014) BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res* **42**: D737–D743.

Patrick, K.L. (2007) 454 Life Sciences: Illuminating the future of genome sequencing and personalized medicine. *Yale J Biol Med* **80**: 191–194.

Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P., and Frey, J. (2005) Microarray-Based Detection of 90 Antibiotic Resistance Genes of Gram-Positive Bacteria. *J Clin Microbiol* **43**: 2291.

Qian, X., Gunturu, S., Guo, J., Chai, B., Cole, J.R., Gu, J., and Tiedje, J.M. (2021) Metagenomic analysis reveals the shared and distinct features of the soil resistome across tundra, temperate prairie, and tropical ecosystems. *Microbiome* **9**: 1–13.

Reller, B.L., Weinsten, M., Jorgensen, J.H., and Ferraro, M.J. (2009) Antimicrobial susceptibility

- testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* **49**: 1749–1755.
- Reygaert, W.C. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* **4**: 482–501.
- Rhoads, A. and Au, K.F. (2015) PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **13**: 278–289.
- Rivoarilala, L.O., Victor, J., Crucitti, T., and Collard, J.M. (2021) LAMP assays for the simple and rapid detection of clinically important urinary pathogens including the detection of resistance to 3rd generation cephalosporins. *BMC Infect Dis* **21**:
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., et al. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci Total Environ* **447**: 345–360.
- Rosini, R., Nicchi, S., Pizza, M., and Rappuoli, R. (2020) Vaccines Against Antimicrobial Resistance. *Front Immunol* **11**: 1048.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463–5467.
- Schadt, E.E., Turner, S., and Kasarskis, A. (2010) A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet* **19**: 227–240.
- Staley, J.T. and Konopka, A. (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321–346.
- Thomas, C.M. and Nielsen, K.M. (2005) Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 711–721.
- Ventola, C.L. (2015) The antibiotic resistance crisis: causes and threats. *P T J* **40**: 277–83.
- Wright, G.D. (2010) Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol* **8**: 1–6.
- Yan, J. and Bassler, B.L. (2019) Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe* **26**: 15–21.
- Zhang, A.N., Gaston, J.M., Dai, C.L., Zhao, S., Poyet, M., Groussin, M., et al. (2021) An omics-based framework for assessing the health risk of antimicrobial resistance genes. *Nat Commun* **12**: 1–11.
- Zurenko, G.E., Gibson, J.K., Shinabarger, D.L., Aristoff, P.A., Ford, C.W., and Tarpley, W.G. (2001) Oxazolidinones: a new class of antibacterials. *Curr Opin Pharmacol* **1**: 470–476.

SECCIÓN 2: TRABAJOS PUBLICADOS



CAPÍTULO 1

A Resistome Roadmap: From the Human Body to Pristine Environments.

Lucía Maestre-Carballa¹, Vicente Navarro-López² and Manuel Martínez-García¹.

¹Department of Physiology, Genetics and Microbiology, University of Alicante, Alicante, Spain

²Clinical Microbiology and Infectious Disease Unit, Hospital Universitario Vinalopó, Elche, Spain

Front. Microbiol. 2022. May 13:858831. doi: 10.3389/fmicb.2022.858831

Abstract

A comprehensive characterization of the human body resistome [sets of antibiotic resistance genes (ARGs)] is yet to be done and paramount for addressing the antibiotic microbial resistance threat. Here, we study the resistome of 771 samples from five major body parts (skin, nares, vagina, gut, and oral cavity) of healthy subjects from the Human Microbiome Project and addressed the potential dispersion of ARGs in pristine environments. A total of 28,714 ARGs belonging to 235 different ARG types were found in the HMP proteome dataset ($n = 9.1 \times 10^7$ proteins analyzed). Our study reveals a distinct resistome profile (ARG type and abundance) between body sites and high interindividual variability. Nares had the highest ARG load (≈ 5.4 genes/genome) followed by the oral cavity, whereas the gut showed one of the highest ARG richness (shared with nares) but the lowest abundance (≈ 1.3 genes/genome). The fluoroquinolone resistance genes were the most abundant in the human body, followed by macrolide–lincosamide–streptogramin (MLS) or tetracycline. Most ARGs belonged to common bacterial commensals and multidrug resistance trait were predominant in the nares and vagina. Many ARGs detected here were considered as low risk for human health, whereas only a few of them, such as *BlaZ*, *dfrA14*, *dfrA17*, or *tetM*, were classified as high-risk ARG. Our data also provide hope, since the spread of common ARG from the human body to pristine environments ($n = 271$ samples; 77 Gb of sequencing data and 2.1×10^8 proteins analyzed) thus far remains very unlikely (only one case found in an autochthonous bacterium from a pristine environment). These findings broaden our understanding of ARG in the context of the human microbiome and the One-Health Initiative of WHO uniting human host–microbes and environments as a whole.

CAPÍTULO 2

Insights into the antibiotic resistance dissemination in a wastewater effluent microbiome: bacteria, viruses and vesicles matter

Lucía Maestre-Carballa¹, Mónica Lluesma Gomez¹, Andrea Angla Navarro¹, Inmaculada Garcia-Heredia¹, Francisco Martinez-Hernandez¹ and Manuel Martinez-Garcia¹.

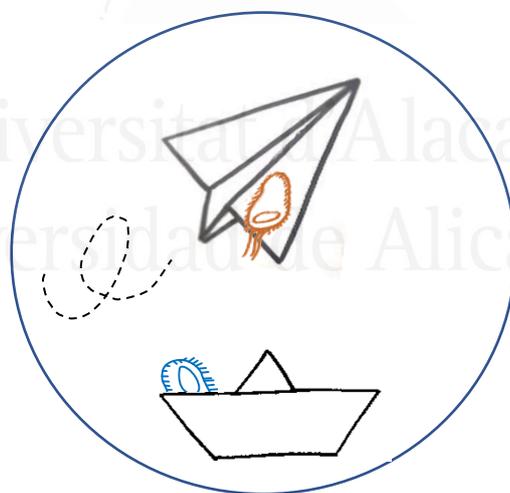
¹Department of Physiology, Genetics, and Microbiology, University of Alicante, C/San Vicente s/n, 03080, Alicante, Spain.

Environ Microbiol. 2019 Dec;21(12):4582-4596. doi: 10.1111/1462-2920.14758

Abstract

Wastewater treatment plants effluents are considered as hotspots for the dispersion of antibiotic resistance genes (ARGs) into natural ecosystems. The bacterial resistome (ARG collection in a metagenome) analyses have provided clues on antibacterial resistance dynamics. However, viruses and vesicles are frequently ignored. Here, we addressed the bacterial, viral and vesicle resistomes from a representative wastewater effluent in natural conditions and amended with polymyxin, which is used as a last resort antibiotic. Metagenomics showed that the natural prokaryotic resistome was vast (9000 ARG hits/Gb metagenome) and diverse, while viral resistome was two orders of magnitude lower (50 ARG hits/Gb metagenome) suggesting that viruses rarely encoded ARGs. After polymyxin amendment, data showed no ARG enrichment - including to polymyxin - in the microbiome. Remarkably, microbiomes responded to polymyxin with a vast release of putative vesicles (threefold increase compared with the control), which might be used as 'traps' to decrease the antibiotic concentration. Intriguingly, although polymyxin resistance genes (PRGs) were rare in the microbiome (0.018% of total ARG found), in the viral and vesicle fractions, PRGs were more abundant (0.5%-0.8% of total ARG found). Our data suggest that vesicles could have a more active role in the context of transmission of antibiotic resistances.

SECCIÓN 3: TRABAJOS NO PUBLICADOS



CAPÍTULO 3

Dinámica de los genes de resistencia a antibióticos en las aguas de la ciudad de Alicante.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Introducción

El agua es uno de los recursos más importantes de nuestro planeta ya que es esencial para la vida. Esta cubre aproximadamente el 71% de la corteza terrestre siendo su volumen de aproximadamente $1386 \times 10^6 \text{ km}^3$, de la cuál un 96,5% es agua salada (Williams, 2014). Los ecosistemas acuáticos, además de ser hábitats indispensables para la vida, constituyen también rutas de propagación de bacterias, jugando un papel importante en la diseminación de GRA entre humanos, animales y el propio ecosistema (Vaz-Moreira *et al.*, 2014). Las aguas son también vías de dispersión de virus que, aunque de manera poco frecuente, pueden transportar GRA (Enault *et al.*, 2017).

El agua puede transportar antibióticos procedentes de su uso en humanos, ganadería y acuicultura, lo que favorecería la adquisición de resistencia bacteriana frente a estos (Rizzo *et al.*, 2013). Un ejemplo de esto es el estudio realizado en el río Dongjiang (uno de los ríos con mayor presencia de antibióticos en China) en el que se vertieron 339 toneladas de 36 antibióticos a la cuenca fluvial (S. X. Zhang *et al.*, 2020). En el estudio de Zhang *et al.* (2020) se estimó que 240 toneladas de estos antibióticos fueron excretadas por animales directamente al río sin tratamiento. Incluso tras tratar las aguas residuales, es importante tener en cuenta que las depuradoras no son siempre capaces de eliminar al completo la presencia de antibióticos. Este fenómeno fue observado en 13 depuradoras europeas (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2020), por lo que los antibióticos pueden ser liberados al medio ambiente incluso tras el tratamiento de las aguas residuales.

En los ambientes urbanos, el ciclo del agua se puede dividir en dos grandes grupos: i) la toma de agua dulce para su posterior potabilización, distribución y uso y ii) el transporte de aguas residuales hasta las depuradoras y su tratamiento antes de devolverlas al ecosistema (Manaia *et al.*, 2016). Dada la importancia del agua y su potencial capacidad de dispersar GRA con su consecuente riesgo para la salud humana, hay numerosos estudios dedicados a explorar la presencia de GRA en las diferentes fases de este ciclo, tanto en el agua por potabilizar (Thakali *et al.*, 2022), como la potable (Wang *et al.*, 2016; Thakali *et al.*, 2022), aguas residuales de diferente origen (Hendriksen *et al.*, 2019; D. Zhang *et al.*, 2021), aguas depuradas (Huang *et al.*, 2012; Pärnänen *et al.*, 2019) y puntos de descarga de estas aguas depuradas al ecosistema (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2014).

En la literatura encontramos estudios que analizan los GRA en una o varias fases de este ciclo (Huang *et al.*, 2012; Pärnänen *et al.*, 2019; Thakali *et al.*, 2022), demostrando su utilidad para la vigilancia y monitorización de la presencia de GRA en aguas (Hendriksen *et al.*, 2019). En nuestro caso presentamos un estudio metagenómico contextualizado en la ciudad de Alicante donde analizamos la dinámica de GRA presentes tanto en la fracción vírica como procariota de agua por potabilizar, aguas residuales (de hospital y urbana), aguas depuradas y la zona de descarga de estas aguas depuradas, lo que nos permite obtener una instantánea de la dispersión de los GRA en las aguas de la ciudad de Alicante.

Muestreo y procesado de las muestras

De los puntos de muestreo de las aguas de Alicante se analizaron un total de 10 muestras que permitieron analizar la presencia de GRA en la fracción procariota y vírica de las aguas de Alicante. Este capítulo se puede subdividir a su vez en 3 tipos de análisis diferentes según el enfoque de experimental empleado: i) estudio *in silico* de los GRA presentes en ADN mediante metagenómica, ii) estudio de los genes de resistencia *sul2* y *tetW* empleando PCR digital (dPCR) y iii) comparativa de la presencia de GRA en virus de RNA y DNA en las aguas por tratar y depuradas de la depuradora (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Muestras de agua analizadas en este capítulo.

Puntos de muestreo	Muestras obtenidas	Muestras para el estudio de GRA mediante metagenómica	Muestras analizadas con dPCR	Muestras para el estudio de GRA en virus de ARN y ADN
Agua de mar	2	27/02/19 ^B		
			18/11/20 ^B	
Canal de Crevillente	1	20/11/20 ^B		
Salida del hospital	1	14/05/19 ^{A,B}		
Entrada de la depuradora	3	26/03/19 ^{A,B}		19/02/20 ^A
				28/01/20 ^B
Salida de la depuradora	3	11/05/16 ^{A,B}		19/02/20 ^A
				28/01/20 ^B

^A Muestras tomadas para el análisis de la fracción vírica (<0,2 µm). ^B Muestras tomadas para el análisis de fracción bacteriana (>0,2 µm). ^{A,B} indica que ambas fracciones fueron analizadas sobre la misma muestra.

Obtención y procesamiento de las muestras

De los 5 puntos de muestreo (agua por potabilizar del Canal de Crevillente, agua de la salida del hospital, agua de la entrada y salida de la depuradora y agua de mar, cercana a la desembocadura de la depuradora), cuatro de las muestras (todas menos la del mar), se procesaron separando físicamente la “fracción procariota” filtrando la muestra con un filtro de 0,2 µm (Isopore Membrane Filters, Ref. GTTP02500). Sobre estos filtros se realizó la extracción de ácidos nucleicos. La muestra de la fracción procariota del agua de mar fue obtenida del estudio de McMullen *et al.* (2019), en el que las células procariotas fueron separadas también físicamente por centrifugación (30000 g, 90 min) (McMullen *et al.*, 2019). La extracción de los ácidos nucleicos de las muestras se realizó empleando el kit MasterPure Complete DNA and RNA Purification (Epicentre, Ref. MC85200) a excepción de la muestra del canal de Crevillente del trasvase Tajo-Segura que se extrajo con el kit

DNAeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Ref. 47014) como especifica la casa comercial. Las muestras de la salida de la depuradora corresponden a las muestras control del capítulo 2 de esta tesis, por lo que fueron procesadas como se especifica en el mismo.

Para la fracción vírica (<0,2 μm) de las muestras de ADN de la entrada y salida de la depuradora y la salida del hospital se filtró el agua por un filtro con jeringa de 0,2 μm (membrana de PES, Millipore), y el agua filtrada se concentró con ultrafiltración tangencial empleando Vivaflow (polietersulfona, 100 KDa; Sartorius, Ref. VF20P4) hasta un volumen de ≈ 19 mL que se volvió a filtrar con jeringa a través de un filtro de 0,2 μm . El filtrado fue concentrado empleando Amicon ultra-15 (100 KDa; Millipore, Ref. UFC910008) hasta un volumen final de 200 μL . En el caso de la fracción vírica (<0,2 μm) de las muestras de ARN, se muestrearon 5 L de agua de la salida y 5 L de la entrada de la depuradora. Ambas fueron centrifugadas por separado a 10000 g durante 20 minutos (4°C) para eliminar células. El sobrenadante libre de células fue ultraconcentrado empleando ultrafiltración tangencial con Vivaflow (polietersulfona, 100 KDa; Sartorius, Ref. VF20P4) hasta un volumen final de 30 mL. A este se le añadió extracto de carne (Sigma-Aldrich, Ref. B4888-50G) al 3% y NaNO_3 (Scharlau, Ref. SO05010500) 2M (concentración final), ajustando el pH a 5,5. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y la materia sólida se eliminó tras centrifugar a 2500 g durante 10 minutos. El eluido se separó y se ajustó el pH a 7,5. Se añadió polietilenglicol 6000 (PEG; Sigma-Aldrich, Ref. 81253-250G) al 15% y NaCl (Fisher, Ref. BB358-1) al 2% y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C. La mezcla se centrifugó a 10000 g durante 30 min a 4°C, y tras esto, se eliminó el eluido y resuspendió el pellet en 10 mL de PBS (pH 7,4) (Adriaenssens et al., 2018). Se comprobó con una tinción SYBR Gold (ThermoFisher Scientific, REF. S11494) si había bacterias en la muestra y ante la ausencia de estas, se concentró la muestra a un volumen final de 200 μL usando Amicon ultra-15 (100 KDa; Millipore, Ref. UFC910008).

Sobre el concentrado final de las muestras víricas (empleando Amicon) se realizó un pre-procesado para la eliminación de ADN exógeno con Turbo DNase (Invitrogen, Lituania, Ref. AM107) y la descapsidación de los virus empleando proteinasa K (Epicentre, Ref. MPRK092) detallado en el capítulo 2 de esta tesis. Posteriormente se extrajeron los ácidos nucleicos usando Qiamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Ref. 53704) para ARN y ADN, como indica la casa comercial, con la excepción de que para las muestras de ARN en lugar de añadir el *carrier* de ARN proporcionado en el kit, se añadieron 21,25 μL de glucógeno (20 mg/mL; Thermo Scientific, Ref. R0551) a 200 μL del buffer AL. Esta extracción se llevó a cabo con material libre de RNAsas. En el caso de las muestras de ADN no se añadió *carrier*.

La concentración de ADN y ARN fueron medidas con Qubit HS dsDNA (Thermo Fisher Scientific, Ref. Q32854) y HS RNA (Thermo Fisher Scientific, Ref. Q32852) respectivamente. En el caso de las muestras de ARN, primero se digirió el ADN presente en la alícuota incubando la muestra durante 45 minutos con Turbo DNase (Invitrogen, Ref. AM107) favoreciendo el ratio RNA:DNA en la secuenciación.

Secuenciación

Las librerías para las muestras de ADN se realizaron con Nextera XT (Illumina, Ref. FC-131-1024) y fueron secuenciadas con MiSeq Illumina (2x300) a excepción de la del Tajo-Segura que fue secuenciada usando HiSeq X (2x150). La secuenciación fue realizada por Macrogen (Seúl, Rep. de Corea). Las librerías para las muestras de ARN se realizaron para la fracción procariota con Illumina stranded total RNA Prep al que se le añadió el protocolo de depleción de ARN ribosómico (Ribo-Zero Plus) y para la fracción <0,2 μm se preparó la librería con el kit Prep mRNA de TruSeq (TruSeq Stranded mRNA, Illumina) del que no se aplicó el paso de purificación de ARN mensajero, permitiendo que se extrajera todo el ARN de la muestra. Todas las muestras de ARN fueron secuenciadas con HiSeq 2500 (2x125) de la que se obtuvo media carrera. Las librerías y posterior secuenciación de ARN fueron realizadas por la unidad de genómica del Centro de Regulación Genómica (Barcelona, España).

Análisis bioinformático

Las secuencias recibidas se trataron con Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), que elimina cebadores y secuencias de baja calidad (SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36). Las secuencias cortas o *reads* se ensamblaron con SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012), con los parámetros por defecto y el comando “-meta”, para dar lugar a *contigs* o fragmentos genómicos. De éstos, únicamente se emplearon aquellos con una longitud mínima de 500 pb para obtener los ORFs mediante el programa Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010). Para el estudio de GRA, se compararon mediante Blast (NCBI) los datos ensamblados y sin ensamblar contra las bases de datos CARD (Jia *et al.*, 2017), ARG_ANNOT (Gupta *et al.*, 2014) y RESFAMS (Gibson *et al.*, 2015). Únicamente se consideró para el análisis, el *best-hit* (mejor resultado encontrado) con un e-value <10⁻⁵, bit-score ≥ 70 e identidad $\geq 50\%$ o $\geq 90\%$. Los genes constitutivos (*housekeeping genes*) incluidos en las bases de datos que contenían mutaciones que le conferían potencial capacidad de resistencia a antibióticos no fueron incluidos en el análisis. Los GRA se agruparon según la clase de antibiótico al que dan resistencia de acuerdo con CARD (Jia *et al.*, 2017) y si alguno de los GRA no aparecía en esta base de datos, se le asignó el nombre establecido en la base de datos nr de la NCBI. La abundancia de GRA se calculó como el número de *best-hit* encontrados entre las Megabases (Mb) analizadas en la parte sin ensamblar, y en la parte ensamblada se dividió por la longitud total en Mb de los *contigs*.

Una vez obtenidos los hits con GRA para las muestras de agua, estos se compararon entre sí mediante un diagrama de Venn realizado en la página de bioinformatics UGent (https://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html).

Además de la separación física (mediante filtros de 0,2 μm) de la parte procariota y la vírica, también se emplearon métodos informáticos para discernir fragmentos genómicos de origen vírico de aquellos de origen procariota. Para ello, todas las muestras ensambladas se analizaron con VIRSorter2 (Guo *et al.*, 2021), identificando aquellos “*contigs* víricos” (max.score $\geq 0,9$) presentes en la fracción <0,2 μm y en la >0,2 μm que unidos,

pertenecerían a la llamada, de aquí en adelante, “presunta fracción vírica”. El resto de *contigs* de los que no se detectaron proteínas víricas, se agruparon en la fracción procariota, estos pueden ser ADN resistente a la ADNasa empleada, fragmentos empaquetados en vesículas o bien virus no detectados con los programas usados (Capítulo 3). La anotación taxonómica de los *contigs* con al menos un GRA se realizó con Kaiju (Menzel *et al.*, 2016), que se comparó con la base de datos nr_euk.

Los *contigs* de las muestras de ARN fueron comparados con modelos *hidden Markov* (HHMs) para la identificación de virus de ARN usando el programa *hmmsearch* (*hmmer.org*) Estos modelos fueron generados empleando *hmmbuild*, presente en HMMER 3.2.2 (*hmmer.org*) con las secuencias de RdRP (transcriptasa dependiente de ARN) de virus de ARN obtenidas de la base de datos IMG/VR (Roux *et al.*, 2021). A estas se sumaron los modelos HHMs para esta proteína descargados de *pfam* (Mistry *et al.*, 2021), y de artículos de virus de ARN (Callanan *et al.*, 2020; Wolf *et al.*, 2020).

Para comparar los datos de la frecuencia relativa de GRA (datos no ensamblados, igual o mayor al 50 y 90% de identidad) con la de antibióticos de uso en humanos en la Comunidad Valenciana (año 2019), se extrajeron los datos de la página web del Plan Nacional de resistencia a antibióticos, tanto los datos de uso de antibióticos hospitalarios como los comunitarios (<https://resistenciaantibioticos.es/es/profesionales/vigilancia/mapas-de-consumo/consumo-antibioticos-humana>). Los datos de consumos están expresados en Dosis Diarias por cada 1000 habitantes y día. Para los datos se calculó la correlación de Spearman y su significancia con el test t-student con el programa estadístico R 4.1.2 (R Core Team, 2007).

PCR digital de los genes *sul2* y *tetW*

Tras los análisis de los GRA *in silico*, se escogieron dos GRA comunes a las cuatro muestras de agua con más influencia antropogénica (hospital, depuradora y agua de mar) detectados por metagenómica. Estos GRA fueron *sul2* y *tetW*, para los que se diseñaron sondas de dPCR que permitieran comparar los datos de abundancia empíricos con aquellos obtenidos *in silico* mediante metagenómica.

Para el diseño de los cebadores y sonda de dPCR se recurrió primero a agrupar las proteínas que fueron consideradas como GRA por identidad al 95%. Esto generó agrupaciones o *clusters* de estas proteínas que permitieron identificar los *contigs* con estos GRA.

Los *contigs* que contenían el gen *tetW* o *sul2* fueron alineados entre sí con MAFFT Alignment v.7.222 (Kato *et al.*, 2002) presente en Geneious v. 9.1.3 y junto a la secuencia “original” de GRA que encontramos en las bases de datos de GRA usadas, una vez alineado todo, se obtuvo la secuencia consenso, es decir, la posición más frecuente para cada uno de los nucleótidos que forman parte del GRA.

En el diseño de los cebadores se introdujo la secuencia consenso en PrimerQuest Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest>) que diseñó los cebadores y sondas aplicables a la secuencia consenso. La especificidad de los cebadores fue comprobada *in*

silico empleando primer-Blast (NCBI) que los comparó con la base de datos nr (NCBI). Las secuencias de los cebadores empleados fueron *tetW_F* (5'->3') TCCAGTGGCACAGATGTAAAG y *tetW_R* (5'->3') CTTTAGCGGAGATCACCAAGAT. Respecto a *sul2*, las secuencias fueron *sul2_F* (5'->3') ATGCGCGCGTCAAAGAA y *sul2_R* (5'->3') ATCTGCCAAACTCGTCGTTATG. Las secuencias de las sondas para dPCR fueron: para *sul2* 5'/6-FAM/CG CAA TGT G/ZEN/A TCC ATG ATG TCG CC/3IABkFQ/3' y para *tetW* 5'/6-FAM/AG GTG TAC C/ZEN/G CTC TTT GGC TGT TT/3IABkFQ/3'.

Para comprobar experimentalmente el funcionamiento de los cebadores, se emplearon en una PCR convencional con las muestras de agua en las que fueron obtenidos. La master-mix fue la siguiente: 18,15 µL de agua mili-Q, 1 µL de cada uno de los cebadores (10 µM), 0,75 µL de MgCl₂ (50 Mm; Invitrogen, Ref. Y02016), 2,5 µL de Buffer 10x (Invitrogen, Ref. Y020228), 0,5 µL de dNTPs 10 mM (Thermo Fisher Scientific, Ref. 10297018), 0,1 µL de Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Ref. 10342020) y 1 µL de muestra. Las condiciones de la PCR fueron: 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C 45 segundos y 72°C durante un minuto y medio. Otra fase de 72°C durante dos minutos y finalmente mantenimiento a 4°C. Los productos de PCR (amplicones) se observaron en un gel de electroforesis y posteriormente se secuenciaron empleando Sanger.

La dPCR se empleó usando los cebadores de *sul2* y *tetW* junto a una sonda de dPCR diseñada con PrimerQuest Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest>). La sonda 5' FAM/ZEN/IB®FQ 3' (PrimeTime®, IDT, Bélgica) estaba marcada con el fluoróforo FAM y dos quenchers o desactivadores de fluorescencia (ZEN y 3IABkFQ). A 7,25 µL de MasterMix QuantStudio 3D DIGITAL PCR V2 MMX (ThermoFisher Scientific, Ref. APPA26316), se añadieron 4,14 µL de agua mili-Q, 0,63 µL de cada uno de los cebadores (10 µM), 0,35 µL de la sonda (10 µM), 2,5 µL de MgCl₂ (50 Mm) y 1 µL de muestra. Los 14,5 µL de la mezcla se cargaron en los chips de dPCR (QuantStudio 3D DCPR V2 20K CHIP 12-PACK, ThermoFisher Scientific, Ref. A26316). Las condiciones de PCR fueron: 95°C durante 10 minutos, 30 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 55°C 45 segundos y 60°C durante un minuto. Otra fase de 60°C durante dos minutos y finalmente mantenimiento a 4°C. Antes de leer los chips (QuantStudio™ 3D Digital PCR Instrument; ThermoFisher Scientific, Ref. 4489084) se atemperaron en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiental. Los datos se analizaron con el software QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ (ThermoFisher Scientific). Para la cuantificación de ambos GRA se dividieron el número de copias encontradas por los ng de muestra extraídos.

Para verificar la correcta amplificación de los GRA durante la dPCR, el producto de la dPCR fue extraído y se realizó una *nested*-PCR con los cebadores de ambos GRA con los ciclos de la PCR convencional antes mencionadas y con la siguiente composición: 21,25 µL de MasterMix QuantStudio 3D DIGITAL PCR V2 MMX (ThermoFisher Scientific, Ref. APPA26316), 1 µL de cada uno de los cebadores (10 µM), 0,75 µL de MgCl₂ (50 Mm; Invitrogen, Ref. Y02016) y 1 µL de producto de dPCR.

La comparación de la cuantificación para ambos genes se hizo comparando de los datos de metagenómica, aquellos hits encontrados con un 50% de identidad con los GRA presentes

las bases de datos usadas (datos ensamblados y no ensamblados), mientras que para los valores de la dPCR se empleó el número de copias del GRA por ng extraído.

Resultados y Discusión

1) Análisis metagenómico: Abundancia *in silico* de los genes de resistencia a antibióticos en las muestras de ADN

Para el análisis metagenómico de la dinámica de GRA en las aguas de Alicante se analizaron muestras del canal de Crevillente (agua por potabilizar), agua residual del Hospital General de Alicante, agua residual en la entrada de la depuradora L'Alacantí Nord y salida de la misma, junto a una muestra de agua de mar cercana a la desembocadura de la depuradora (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Volumen procesado y concentración de ácidos nucleicos obtenida para las muestras estudiadas.

Muestra	Fecha	Fracción estudiada	Concentración de la extracción (ng/μL)		Tipo de estudio ¹
			ADN	ARN	
Agua de mar	27/02/19	>0,2 μm	1,44±0,12	-	<i>in silico</i>
	18/11/20	>0,2 μm	0,23±0,03	-	dPCR
Canal de Crevillente	20/11/20	>0,2 μm	7,84±0,69	-	<i>in silico</i>
Hospital	14/05/19	>0,2 μm	33±0,25	-	<i>in silico</i> + dPCR
		<0,2 μm	9,95±0,08	-	<i>in silico</i>
Entrada depuradora	26/03/19	>0,2 μm	105,6±0,06	-	<i>in silico</i> + dPCR
		<0,2 μm	0,77 ±0,01	-	<i>in silico</i>
	28/01/20	>0,2 μm	168,6±0,06	426±33	ARN vs. ADN
	19/02/20	<0,2 μm	37,50±0,07	2,89±0,02	ARN vs. ADN
Salida depuradora	11/05/16	>0,2 μm	16,26±1,56	-	<i>in silico</i> + dPCR
		<0,2 μm	9,68±4,78	-	<i>in silico</i>
	28/01/20	>0,2 μm	192,3±0,06	135±0	ARN vs. ADN
	19/02/20	<0,2 μm	39,48±1,52	3,22±0,01	ARN vs. ADN

¹Tipos de estudio realizados en este capítulo: "*in silico*" se refiere al análisis bioinformático de GRA en las muestras de ADN. "dPCR" para el análisis de los GRA *tetW* y *sul2* con esta técnica y "ARN vs ADN" para el análisis de la presencia de GRA en *contigs* víricos de ARN y ADN.

Para el estudio metagenómico se analizaron un total de 74 Gb secuenciados pertenecientes a 8 muestras de diferentes aguas de la ciudad de Alicante (Tabla 3.2). Entre un 89% y un 97,55% de las lecturas superaron el umbral de calidad establecido con Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014). Tras ensamblar los datos, trabajamos únicamente con *contigs* con más de 500 pb cuyo número osciló entre 115394 y 509410 según la muestra (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Datos iniciales secuenciados por muestra (Gb), % de lecturas conservadas tras emplear Trimmomatic y contigs >500 pb analizados.

Ácido nucleico extraído	Muestra	Gb iniciales	Lecturas conservadas (%)	N Contigs > 500 pb
ADN	Agua de mar	20,58	89,10	509410
	Canal de Crevillente	31,04	89,16	194282
	Hospital > 0,2 µm	2,36	93,03	120532
	Hospital < 0,2 µm	3,18	92,36	154677
	Entrada depuradora > 0,2 µm	2,58	93,34	231647
	Entrada depuradora < 0,2 µm	3,00	91,90	331760
	Salida depuradora > 0,2 µm	4,75	97,55	115394
	Salida depuradora < 0,2 µm	6,51	96,58	48186

Tras la detección de GRA en las muestras analizadas mediante análisis bioinformático, encontramos que dentro de la fracción procarionta, es en el hospital donde existe una mayor riqueza de GRA, es decir, de entre todas las muestras, es la que mayor número de GRA diferentes tiene (803 GRA distintos; Tabla 3.3), siendo el agua de mar o el canal de Crevillente (según la identidad y si están ensamblados) las que menor riqueza de GRA presentan (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Número de GRA diferentes encontrados para las muestras de Alicante.

Muestra	Nucleótidos bs70, id50% ¹	Nucleótidos bs70, id90%	Proteínas bs70, id50%	Proteínas bs70, id90%
Agua de mar	307	95	127	8
Canal de Crevillente	406	75	148	2
Hospital > 0,2 µm	803	449	322	166
Hospital < 0,2 µm	254	79	42	12
Entrada depuradora > 0,2 µm	767	360	301	110
Entrada depuradora < 0,2 µm	176	33	23	2
Salida depuradora > 0,2 µm	500	85	176	24
Salida depuradora < 0,2 µm	60	4	3	0

¹El umbral de detección frente a las bases de datos de GRA fue un bit-score ≥ 70 y dos identidades diferentes: ≥ 50 y $\geq 90\%$.

Como se muestra en la Figura 3.2, los datos de abundancia de GRA para procariotas estuvieron en torno a 2,5-23 GRA/Mb en los datos no ensamblados y entre 0,003-6 GRA/Mb en los datos ensamblados, siendo mayor para el hospital y la entrada de la depuradora, tradicionalmente considerados como puntos calientes de la dispersión de GRA (Kunhikannan *et al.*, 2021), y menor para el canal de Crevillente y el mar. También se observa el efecto “reductor” de GRA producido por la depuradora, descrito en otras publicaciones (Huang *et al.*, 2012; Pärnänen *et al.*, 2019). En este caso observamos que la abundancia de GRA en la salida de la depuradora disminuye aproximadamente 4 veces con respecto a la entrada de la misma, y cuya concentración disminuye en la muestra de agua de mar estudiada (Figura 3.2).

Aunque la abundancia de GRA en virus es escasa en relación con la abundancia en procariotas, siendo entre 27 veces menor en el hospital y 116 veces menor en la salida de la depuradora, vemos como comparando todas las muestras, es en el hospital donde hay una mayor abundancia de GRA tanto en la parte no ensamblada como en la “presunta fracción vírica” (Figura 3.2), que se corresponde a los *contigs* víricos identificados de la fracción procariota (>0,2 μm) y vírica (<0,2 μm).

Dentro de una misma muestra, la abundancia de los GRA varía en función de si los datos están ensamblados o no lo están. Este es un fenómeno normal ya que habitualmente no todas las lecturas que encontramos en la parte no ensamblada se unen para dar lugar a *contigs*, lo que produce una “pérdida” de la información durante el ensamblaje metagenómico (Figura 3.2).

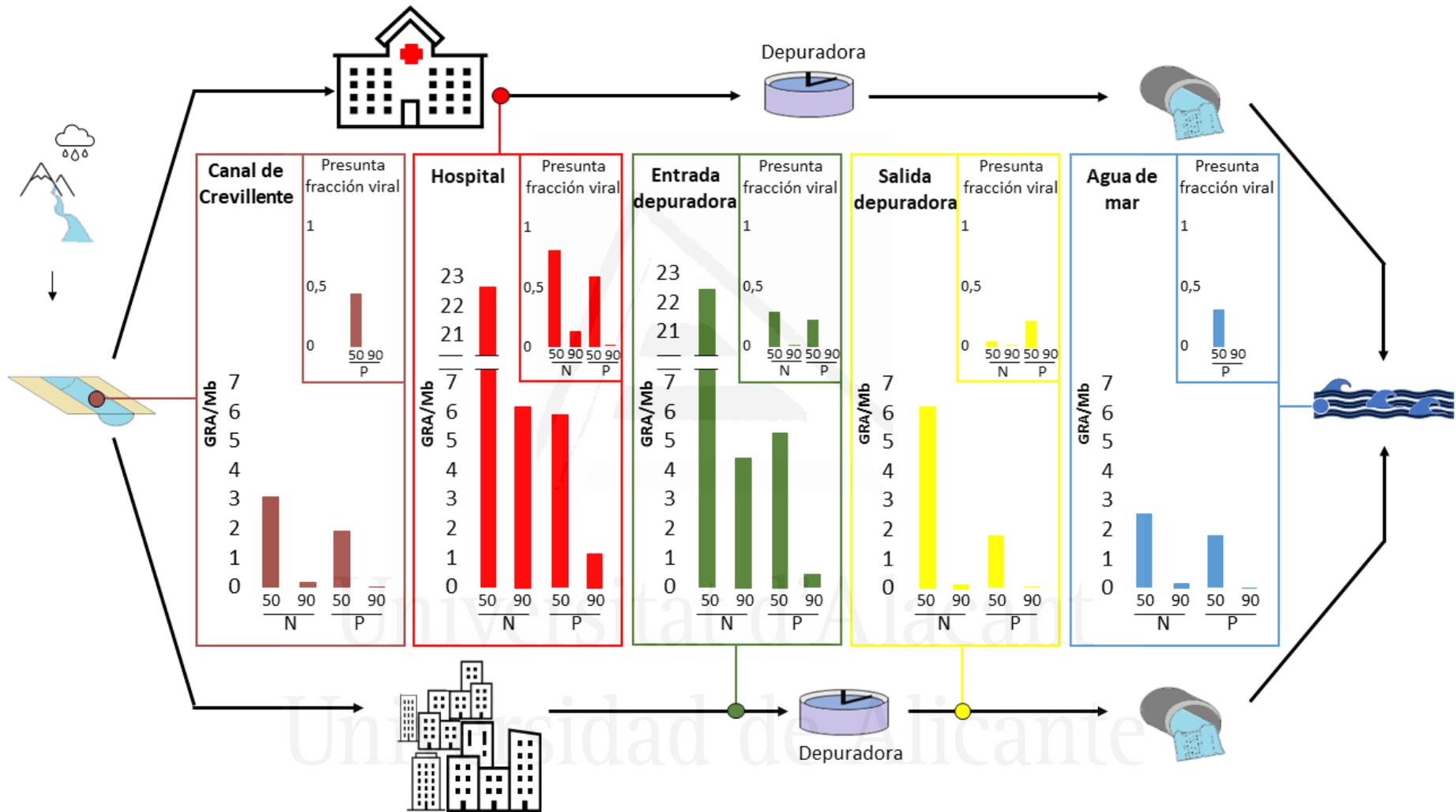


Figura 3.2. Abundancia de GRA en diferentes aguas de Alicante. Para los datos ensamblados (P de proteínas) y no ensamblados (N de nucleótidos) se analizó la abundancia de GRA para las identidades $\geq 50\%$ y $\geq 90\%$ con las bases de datos de GRA. Los gráficos de la parte inferior corresponden a la fracción procariota ($>0,2 \mu\text{m}$). En la parte ensamblada (P) de la presunta fracción vírica se agruparon los contigs con origen vírico encontrados in silico para las dos fracciones estudiadas (procariota y vírica).

Habitualmente en la literatura, se describe una mayor riqueza y abundancia de GRA en aguas de hospital que en otras aguas residuales (Hassoun-Kheir *et al.*, 2020), aunque también se ha descrito una abundancia similar en ambas aguas; cabe destacar que este estudio cuantificó únicamente los genes *bla*TEM, *erm*B, *qnr*S, *sul*I y *tet*W mediante qPCR (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2014). Sin embargo, en un estudio metagenómico llevado a cabo en la India por el grupo de Dengwei Zhang *et al.* (2021) en muestras de agua de la ciudad de Jaipur, se comprobó que la riqueza y abundancia de GRA fueron menores en una depuradora proveniente exclusivamente de un hospital comparada con la de otras tres depuradoras provenientes de la ciudad india. Este resultado fue atribuido, entre otros factores, a una baja abundancia de bacterias fecales presentes en el agua del hospital junto a la alta tasa de automedicación existente en este país (D. Zhang *et al.*, 2021).

A pesar de la amplia variabilidad en la abundancia de GRA observada entre las muestras de agua de Alicante (Figura 3.2), las clases de antibióticos a las que más resistencia encontramos (abundancia relativa $\geq 5\%$; Figura 3.3) fueron comunes a todas las muestras analizadas.



Figura 3.3. GRA agrupados por la clase de antibiótico contra el que proporcionan resistencia cuya frecuencia relativa es superior o igual al 5% en las aguas de Alicante. *0,2f* hace referencia a la fracción vírica (filtrada por 0,2 μ m).

Aun encontrando resistencia a las mismas familias de antibióticos en las distintas muestras, lo que varió fue la frecuencia relativa de los genes de resistencia a estos antibióticos, existiendo una separación clara entre las muestras de la fracción vírica (<0,2 μ m) y la procariota (>0,2 μ m) para los datos analizados con la excepción de la muestra ensamblada con los GRA detectados a una identidad proteica $\geq 90\%$ (Figura 3.4).

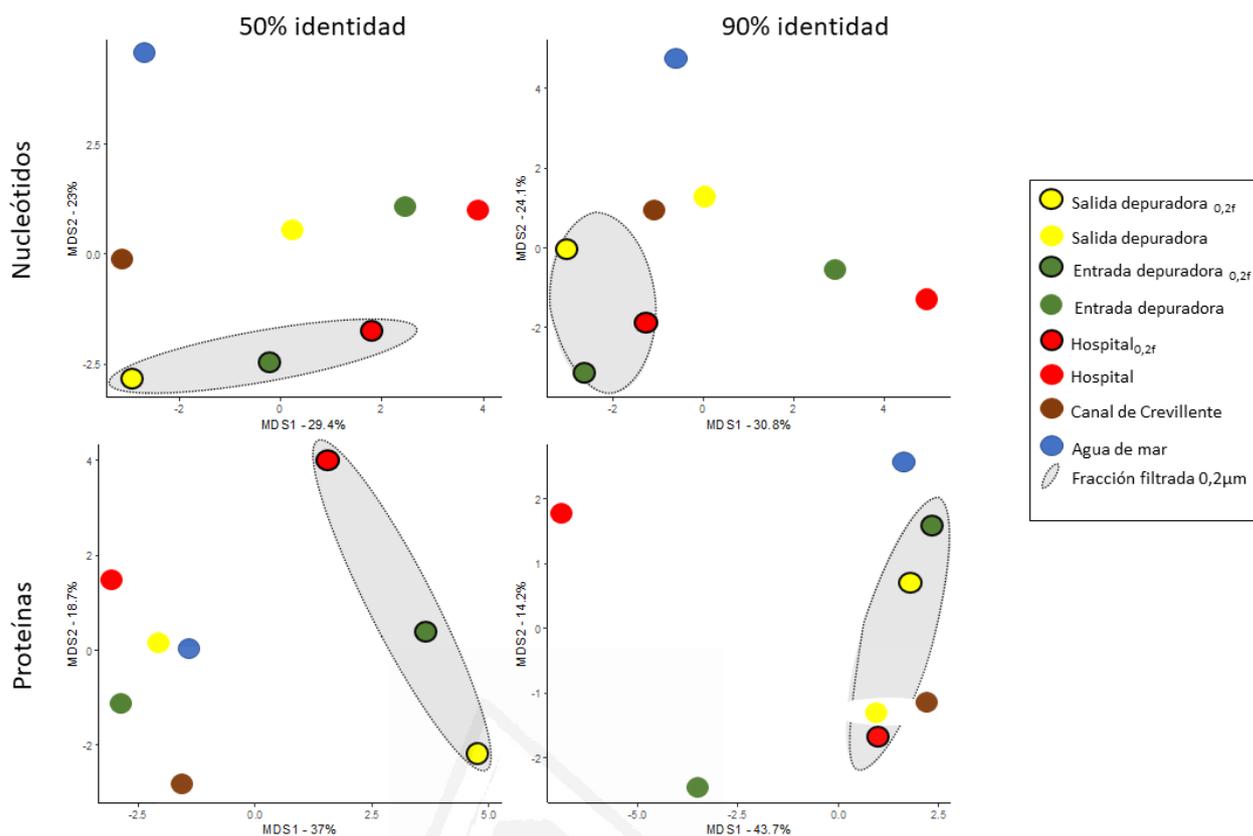


Figura 3.4. Análisis de las coordenadas principales (AcoP) del resistoma de diferentes muestras de agua de Alicante.

En las aguas de Alicante, tanto en los datos no ensamblados como ensamblados, vemos una mayor abundancia relativa de GRA que otorgan resistencia a multi-antibióticos para todas las muestras. En segunda posición están los genes que confieren resistencia a beta-lactámicos, MLS (Macrólidos-Lincosamidas-Estreptomicinas), nitroimidazoles o tetraciclinas en función de los datos analizados. En un meta-análisis sobre artículos que estudiaban GRA en aguas residuales de hospital, se observó a nivel global la alta presencia de GRA que conferían resistencia a beta-lactámicos, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas y quinolonas (S. Zhang *et al.*, 2020). En nuestro caso, en la fracción procariota del hospital se encontró una alta frecuencia relativa (>5%) para los genes que confieren resistencia a tetraciclinas, beta-lactámicos y macrólidos, siendo menos relevantes sulfonamidas y quinolonas (Figura 3.3).

Igual que las abundancias relativas de los genes de resistencia agrupados por antibióticos a los que confieren resistencia variaron en función de los datos analizados (Figura 3.3), los GRA más frecuentes también lo hicieron. Entre los más frecuentes para todas las muestras analizadas se encuentra *msbA* (bomba de flujo) a identidad $\geq 50\%$ (tanto ensamblado como no ensamblado), mientras que para la identidad mayor o igual al 90% los GRA más frecuentes varían en función de la muestra y si los datos están o no ensamblados. Destacamos la presencia de *msrE* y *mphE* en aguas altamente antropizadas (hospital y entrada de depuradora), clasificados como dos de los quince GRA más abundantes en las

aguas residuales y los dos más frecuentes en una depuradora de Barcelona (Hendriksen *et al.*, 2019), coincidiendo con nuestros datos a identidad $\geq 90\%$ en los datos no ensamblados.

La presencia de GRA en lugares urbanos está afectada por el consumo de antibióticos de la población, aunque está descrito que no de manera directa (Berendonk *et al.*, 2015; Pärnänen *et al.*, 2019). En nuestro caso, comparando los datos de frecuencia relativa de los antibióticos en las aguas de Alicante en conjunto y con únicamente la del hospital, vemos en la Tabla 3.4 como no hay una relación directa entre estos y el consumo de antibióticos en el año 2019 para la Comunidad Valenciana en el sector hospitalario público ni en el sector comunitario (que junto al hospitalario incluye prescripción de antibióticos del sector privado y mutuas; p-value $>0,05$; Tabla 3.4). Igual que en nuestro caso, en 12 depuradoras de Europa no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la abundancia relativa de GRA en la salida de depuradora y el consumo de antibióticos en el sector de atención primaria (Pärnänen *et al.*, 2019). Sí que observamos una influencia ya que los principales antibióticos recetados en la Comunidad Valenciana (beta-lactámicos, quinolonas, MLS, sulfonamidas, tetraciclinas y aminoglucósidos) suponen entre un 51-61% del total de los GRA (identidad $\geq 90\%$) encontrados en las aguas de Alicante.

Tabla 3.4. Cálculos de las correlaciones y significancia del consumo de antibióticos en la Comunidad Valenciana y la frecuencia relativa de estos en muestras sin ensamblar de las aguas de Alicante.

Muestra	Identidad vs bases de datos de ARG (%)	Estadístico ¹	DHD Hospital	DHD Comunitario
Metagenoma Hospital	≥ 50	r	0,31	0,65
		R ²	0,1	0,43
		p-value	0,56	0,18
	≥ 90	r	-0,26	0,49
		R ²	0,07	0,23
		p-value	0,65	0,35
Metagenoma Alicante	≥ 50	r	0,66	0,65
		R ²	0,43	0,43
		p-value	0,18	0,18
	≥ 90	r	0,48	-0,1
		R ²	0,23	0,01
		p-value	0,36	0,91

¹ Los estadísticos aquí presentados corresponden al coeficiente de Spearman (r), coeficiente de determinación (R²) y la significancia de la correlación (p-value).

Este desajuste entre la presencia de GRA y el consumo de éstos puede deberse en parte a la falta de otros datos complementarios como el consumo de antibióticos en ganadería o el consumo indirecto a través de la alimentación (Lee, 2003). Además, es importante destacar que hay otros condicionantes que afectan más directamente a la presencia de GRA en lugares antropizados: factores ambientales (temperatura), sistemas de saneamiento de aguas y el estado socio-económico de la región de estudio (Hendriksen *et al.*, 2019).

Una vez determinada la presencia de GRA en las aguas de Alicante, el siguiente paso consistió en explorar la posible transferencia horizontal de GRA entre bacterias de diferentes tipos de aguas, para lo que se emplearon todos los metagenomas de la fracción procariota y se estudiaron los GRA en común en los datos ensamblados y no ensamblados (Figura 3.5).

Analizando los GRA comunes entre las muestras de la fracción procariota de los tipos de aguas estudiadas, detectamos desde 19 a 172 GRA presentes en las 5 muestras analizadas (No ensamblado; Figura 3.5). En el *core*, es decir, el conjunto de GRA comunes a las aguas de Alicante analizadas en los datos no ensamblados con una identidad mayor o igual al 50% encontramos el gen de resistencia a glucopeptidos *vanY*, clasificado en el rango I como “amenaza actual” por su alto potencial de contribuir a que los patógenos adquieran multirresistencia (A. N. Zhang *et al.*, 2021). También encontramos los genes *mcr-3.5*, *mcr-3.11*, *mcr-4*, *mcr-7.1*, *mcr-8*, *mcr-9*, habitualmente presentes en plásmidos, que median resistencia a la colistina, un antibiótico utilizado como último recurso para tratar infecciones de bacterias resistentes a carbapenémicos, que es un beta-lactámico empleado en clínica (Caniaux *et al.*, 2017). Si aumentamos la identidad a $\geq 90\%$, observamos como hay 15 GRA en el *core*, siendo en su mayoría bombas de flujo (11/15; ej. *adeJ*, *acrB*, *mdtB*, *emrB*, *tetA*...). Del grupo de 15, destacamos el gen de resistencia a las sulfonamidas *sul2*, descrito habitualmente en plásmidos, cuya abundancia analizaremos posteriormente por dPCR y metagenómica en el punto 2 de este capítulo.

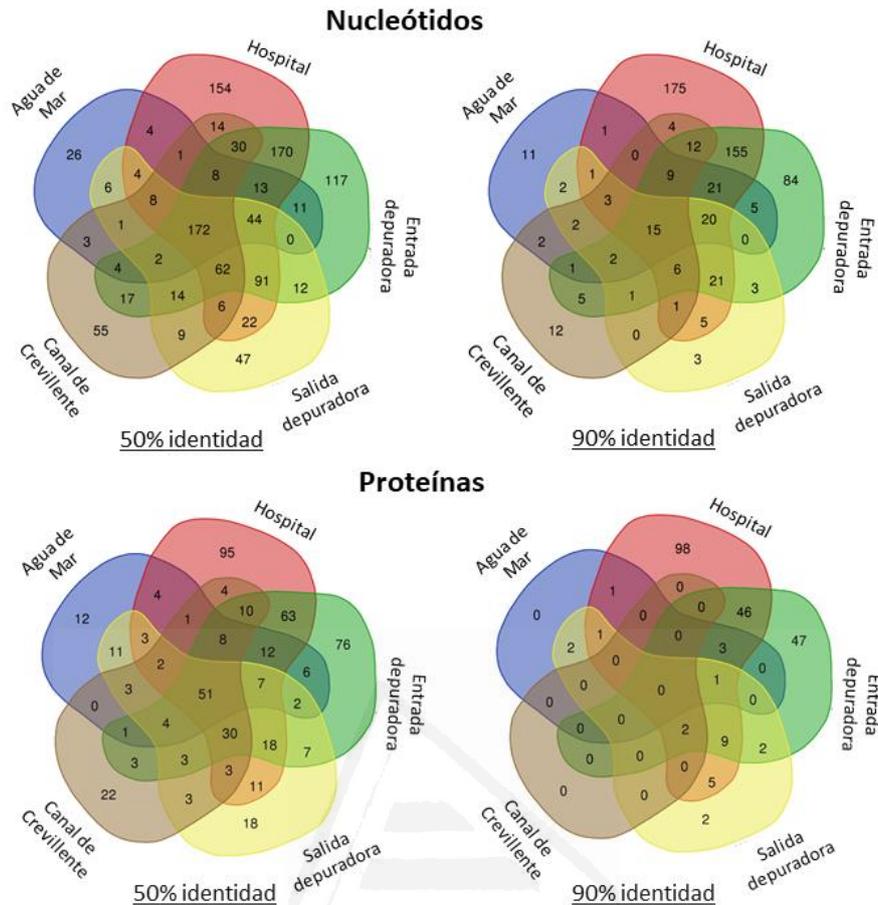


Figura 3.5. Genes de Resistencia a Antibióticos comunes entre las diferentes muestras de agua de Alicante.

Sobre la dispersión, si observamos las tres muestras de la entrada de la depuradora, salida de la depuradora y el mar vemos que la abundancia de GRA disminuye según el flujo de agua avanza (Figura 3.2). De los 904 GRA encontrados en las tres muestras, hay 218 GRA comunes a las tres (no ensamblado, $\geq 50\%$ de identidad). Únicamente el 28% de los GRA presentes en la entrada de la depuradora es transportado hacia la salida y llega hasta el mar (Figura 3.5). El 43% de los GRA presentes en la entrada de la depuradora no son detectados en la salida ni en el agua de mar, lo que confirma el efecto “reductor” de la depuradora a nivel de riqueza de GRA (Huang et al., 2012; Pärnänen et al., 2019) y la baja dispersión de estos según van siendo transportados. Estos datos encajarían con los resultados del capítulo 2 de esta tesis, dónde la detección de GRA de origen humano en lugares prístinos es anecdótica (Capítulo 2, Figura 4).

Una vez determinados y caracterizados los GRA, el foco se puso en las bacterias resistentes portadoras de esos GRA. Para ello, se analizó con el programa Kaiju (Menzel et al., 2016) los contigs que tenían al menos un GRA que otorgaba resistencia a multi-antibióticos, MLS, tetraciclinas y aminoglucósidos, que son los antibióticos a los que más resistencia encontramos en las aguas de Alicante (Figura 3.6).

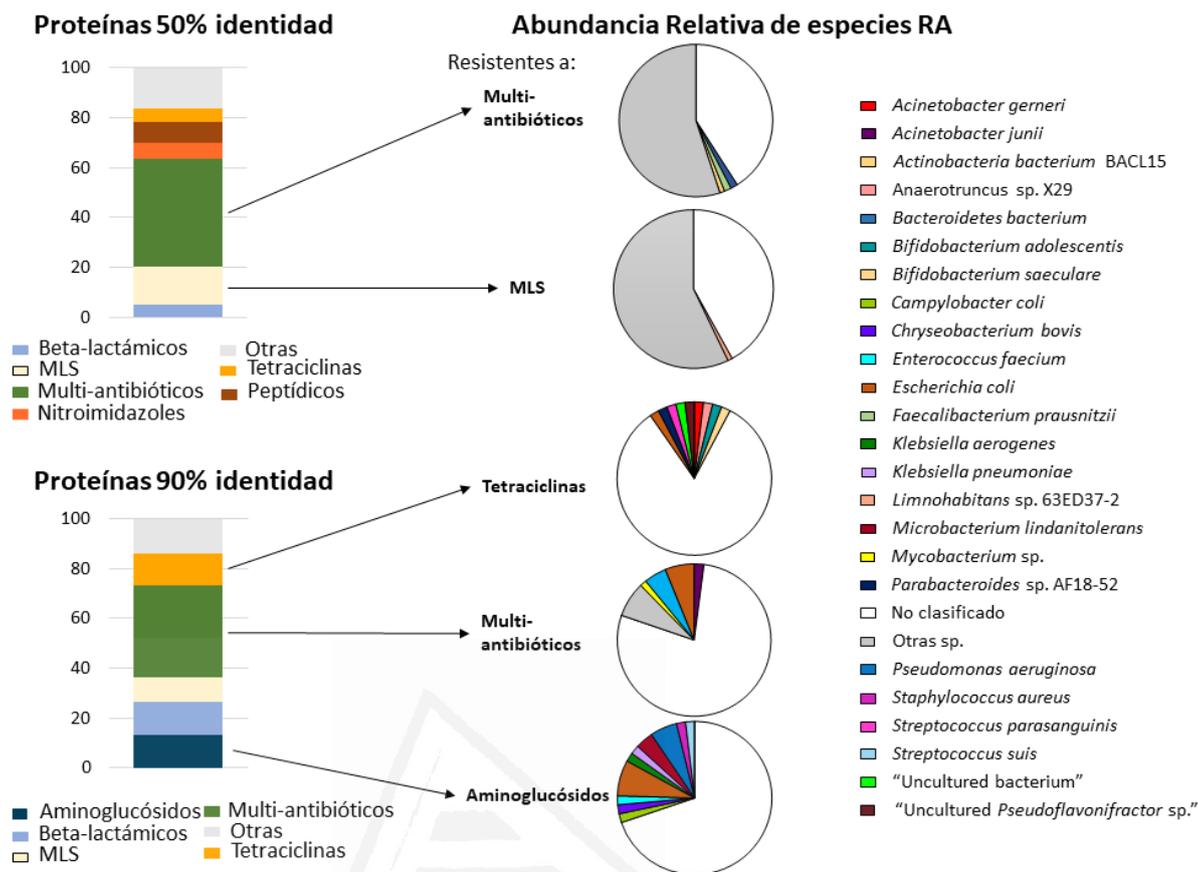


Figura 3.6. Identificación taxonómica de bacterias resistentes más habituales ($\geq 1\%$) con genes de resistencia a las clases de antibiótico más frecuentes en Alicante.

La gran mayoría de *contigs* resistentes no pudieron ser clasificados a nivel de especie por Kaiju ($\approx 41-83\%$). Las principales especies de bacterias resistentes detectadas (abundancia relativa superior al 1%) en las aguas de Alicante fueron bacterias del microbioma humano, tanto comensales como patógenos oportunistas (Figura 3.6). De hecho, alguna de las especies de bacterias resistentes encontradas en las aguas de Alicante coincide con las bacterias resistentes más frecuentes en el sistema digestivo del cuerpo humano como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* (Capítulo 2, Figura 2). Estos resultados concordarían con la hipótesis de que la contaminación fecal es la principal responsable de la abundancia de GRA en lugares antropizados (Karkman *et al.*, 2019).

Para una identidad proteica $\geq 50\%$ de nuestros datos con las bases de datos de GRA encontramos GRA en todas las muestras procariotas ($>0,2 \mu\text{m}$) de agua analizadas que otorguen resistencia frente a multi-antibióticos y MLS (Figura 3.6). Si aumentamos la identidad ($\geq 90\%$) ninguno de los genes que otorgan resistencia a aminoglucósidos, tetracilinas o multi-antibióticos están presentes en todas las muestras, estando los genes que dan resistencia a la tetracilinas (presentes en 9 especies distintas) y multi-antibióticos (presentes en 12 especies distintas) en todas las muestras a excepción de la del canal de Crevillente.

2) Abundancia de *sul2* y *tetW* en las aguas de Alicante.

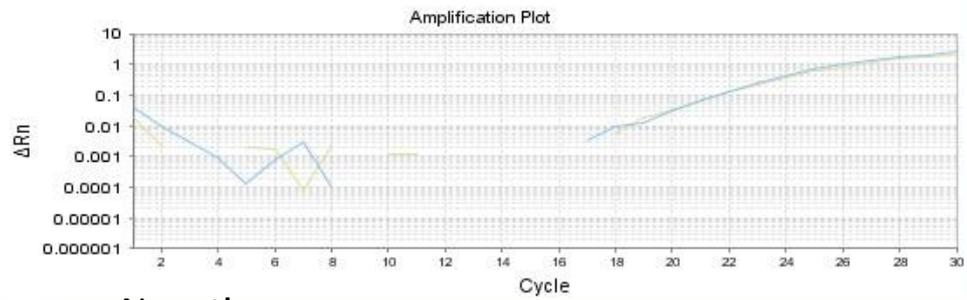
En la actualidad se disponen de diferentes herramientas para la cuantificación de GRA. A nivel de ácidos nucleicos, entre las más empleadas están la PCR (Yang *et al.*, 2021, 2022), el uso de *microarrays* (Perreten *et al.*, 2005; Pärnänen *et al.*, 2019) o la metagenómica (Hu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Hendriksen *et al.*, 2019; He *et al.*, 2020). Una de las herramientas más fiables para la cuantificación absoluta de un gen es la dPCR (Ishii, 2020), la cual consiste en una amplificación mediante PCR a tiempo final, en cuya reacción, además de cebadores, se incluyen sondas fluorescentes que permiten la cuantificación absoluta del gen de interés, sin necesidad de patrones o curvas de calibración. La cuantificación absoluta se realiza mediante la división de la muestra en múltiples reacciones individuales de PCR, las cuales pueden arrojar dos resultados: positivas, es decir, hay presencia de la molécula diana y por tanto se detecta fluorescencia, y negativas. La comparación de las reacciones positivas respecto al total, junto a la aplicación de un factor de corrección de Poisson, proporcionan la cuantificación absoluta de la molécula diana sin la necesidad de curvas de calibración (Quan *et al.*, 2018).

En nuestro caso, compararemos dos técnicas de cuantificación: dPCR y metagenómica. En la bibliografía consultada sólo encontramos un artículo que compare los resultados de dPCR y metagenómica para la identificación de patógenos y GRA en muestras de sangre (Hu *et al.*, 2021). El objetivo, en este caso, es ir un paso más lejos y comparar la cuantificación para dos GRA realizada por ambas herramientas en muestras ambientales.

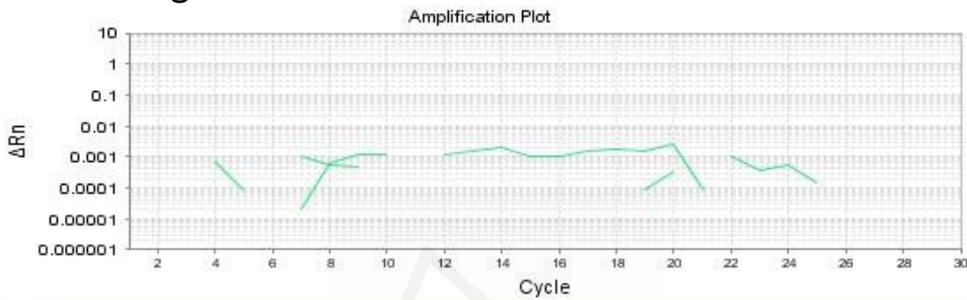
Los dos GRA seleccionados fueron *sul2* y *tetW*, que están presentes en las muestras procariontas de agua del hospital, mar, entrada y salida de la depuradora, lo que nos permite un seguimiento de estas en diferentes lugares conectados entre sí. Ambos GRA son habitualmente detectados en aguas residuales, y están relacionados con el uso de antibióticos en ganadería (Yang *et al.*, 2022). Además, *sul2* (resistencia frente a sulfonamidas) está habitualmente asociado a plásmidos, lo que potencialmente le da una alta movilidad (Jiang *et al.*, 2019). En el caso de *tetW*, que otorga resistencia frente a tetraciclinas protegiendo los ribosomas de ésta, es un gen muy habitual de aguas residuales, posicionado entre los 15 GRA más frecuentes de 79 muestras de agua residual urbana provenientes de 60 países de 5 continentes (Hendriksen *et al.*, 2019).

Tras los análisis de los GRA *in silico* (Tabla 3.2), se escogieron dos GRA comunes a las muestras de hospital, depuradora y agua de mar. Para estos se diseñaron cebadores y sondas de dPCR (descripción en materiales y métodos) que permitieran comparar los datos de abundancia empíricos con aquellos obtenidos *in silico* mediante metagenómica. Previo a su empleo con dPCR, se probaron los cebadores y la sonda en qPCR, demostrando su correcto funcionamiento proporcionando la señal de fluorescencia esperada tanto en los controles positivos como negativos (Figura 3.7).

Positivos



Negativos



■ *sul2+* ■ *sul2-* ■ *tetW+* ■ *tetW-*

Figura 3.7. Resultados de la qPCR para las sondas y cebadores del *sul2* y *tetW* probadas en las aguas del Hospital General de Alicante.

La cuantificación de *sul2* y *tetW* por metagenómica y dPCR se llevó a cabo en 4 muestras de aguas de Alicante, del hospital, de la entrada y salida de la depuradora y en el mar, que se muestran en la Figura 3.8.

Universidad de Alicante

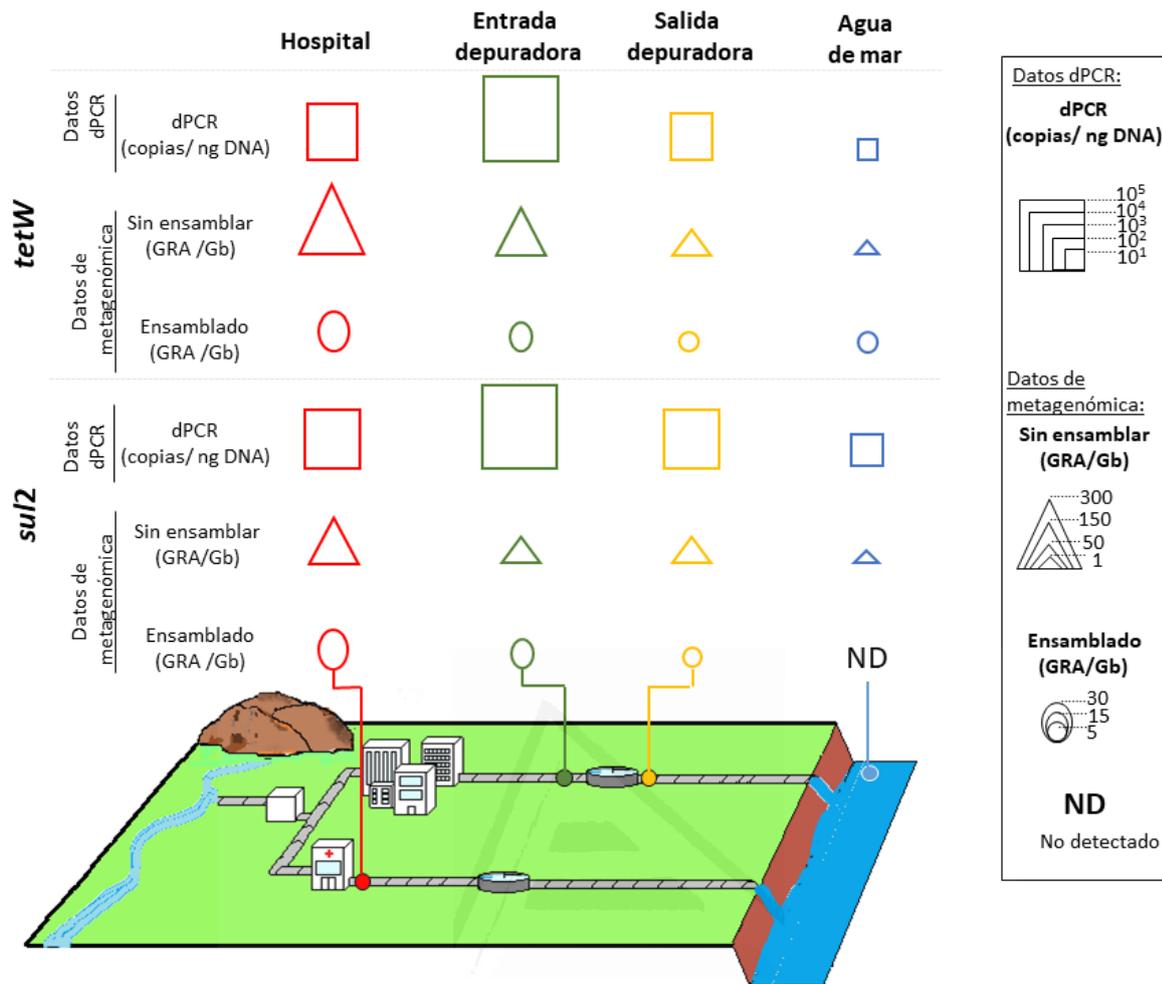


Figura 3.8. Comparación de los datos de *sul2* y *tetW* obtenidos por dPCR y metagenómica. Los genes *tetW* y *sul2* se cuantificaron en cuatro muestras de agua de Alicante: hospital (rojo), entrada (verde) y salida (amarillo) de depuradora y agua de mar (azul). Para la cuantificación se emplearon dos metodologías, los resultados de dPCR expresados en copias/ng DNA extraído (cuadrado) y por metagenómica, que a su vez dio lugar a dos resultados: los datos no ensamblados expresados en GRA/Gb (triángulos) y los datos ensamblados cuantificados como GRA/Gb (círculos). ND implica que no hubo detección del gen para una determinada muestra. Las figuras geométricas hacen referencia a un límite máximo, por ejemplo, si está presente el círculo más pequeño, esto implicará que se han detectado hasta 5 GRA/Gb en la muestra, mientras que el círculo mediano representa un valor comprendido entre 5,01 y 15 GRA/Mb. El círculo más grande representa una abundancia entre 15,1 y 30 GRA/Mb.

Ambos GRA fueron detectados mediante dPCR en todas las muestras de agua analizadas (Figura 3.8). En ambos casos, se detectó una mayor abundancia de *sul2* y *tetW* en la entrada de la depuradora y también para ambos GRA, la abundancia fue menor en el agua de mar. El gen de resistencia *sul2*, cuya abundancia varió entre 21 y 11271 copias/ng DNA extraído, fue más abundante en todas las muestras a excepción de la entrada de la depuradora que *tetW*, del que se detectaron entre 7 y 18662 de copias/ng DNA extraído. Los resultados con dPCR muestran el efecto “reductor” por parte de la depuradora para ambos GRA, afectando más a *tetW* (reducción de 100 veces) que a *sul2* (reducción de aproximadamente 1,5 veces). Extrapolando el número de copias de los GRA a los litros de muestra filtrados obtenemos que *sul2* tiene desde 3×10^2 copias/L en el agua de mar hasta 4×10^9 copias/L en

la entrada de la depuradora. La concentración de *tetW* varió desde 1×10^2 copias/L hasta 7×10^{10} copias/L en el agua de la depuradora.

Respecto a la comparación de la cuantificación con dPCR y metagenómica ambas metodologías señalan que, de las muestras estudiadas, es el agua de mar la que tiene menos presencia de *sul2* y *tetW*, seguida por la salida de la depuradora, coincidiendo con los datos empíricos por dPCR. Además, para ambas se observa el efecto “reductor” de la depuradora (más abundancia de GRA en la entrada que en la salida de la depuradora). Es en el hospital y la entrada de la depuradora donde las metodologías difieren respecto a cuál de las dos tiene más abundancia de los GRA estudiados (Figura 3.8). No se pudo establecer una relación estadísticamente significativa entre la cuantificación de GRA por parte de la dPCR y la cuantificación realizada con los datos metagenómicos.

En la bibliografía encontramos un único artículo que compare los datos obtenidos por metagenómica y dPCR. Este trabajo emplea ambas herramientas para la identificación de patógenos responsables de infecciones sanguíneas siendo la dPCR más rápida y efectiva (detectó 88 patógenos frente a los 53 detectados por metagenómica dentro del rango de la dPCR), e incluso identificando GRA que no fueron detectados por metagenómica (Hu *et al.*, 2021). Mientras que la dPCR da datos precisos sobre el número de copias de un gen (Hu *et al.*, 2021), en el caso de la metagenómica esta información es relativa, demostrándose su utilidad en el campo de la oncología, donde la variación del número de copias de un oncogen o gen de estudio ayuda a la diagnosis y seguimiento de la evolución tumoral (Gu *et al.*, 2021).

Por tanto, tanto la metagenómica como la dPCR son recursos útiles que pueden emplearse en función de las necesidades del estudio.

Empleando Kaiju se anotaron taxonómicamente los *contigs* que portaban *sul2* o *tetW* (Figura 3.9). El gen de resistencia *sul2* fue detectado en la entrada y salida de la depuradora, además de en el hospital, concretamente en dos bacterias pertenecientes a órdenes diferentes: *Enterobacteriales* (*Escherichia coli*) y *Pseudomonadales* (*Acinetobacter johnsonii* XBB1). El gen de resistencia *tetW* fue encontrado en las cuatro muestras de agua analizadas, en *contigs* asignados a diferentes filos como *Cyanobacteria* (*Prochlorococcus* sp. en agua de mar) y *Actinomycetota* (*Bifidobacterium* sp. en la salida de la depuradora y el hospital). La presencia de *tetW* en cianobacterias está documentada en muestras del lago chino de Taihu, demostrando que las cianobacterias pueden representar una importante reserva y fuente para la diseminación de GRA en ambientes acuáticos, acrecentándose el problema cuando suceden los *blooms* (Wang *et al.*, 2020).

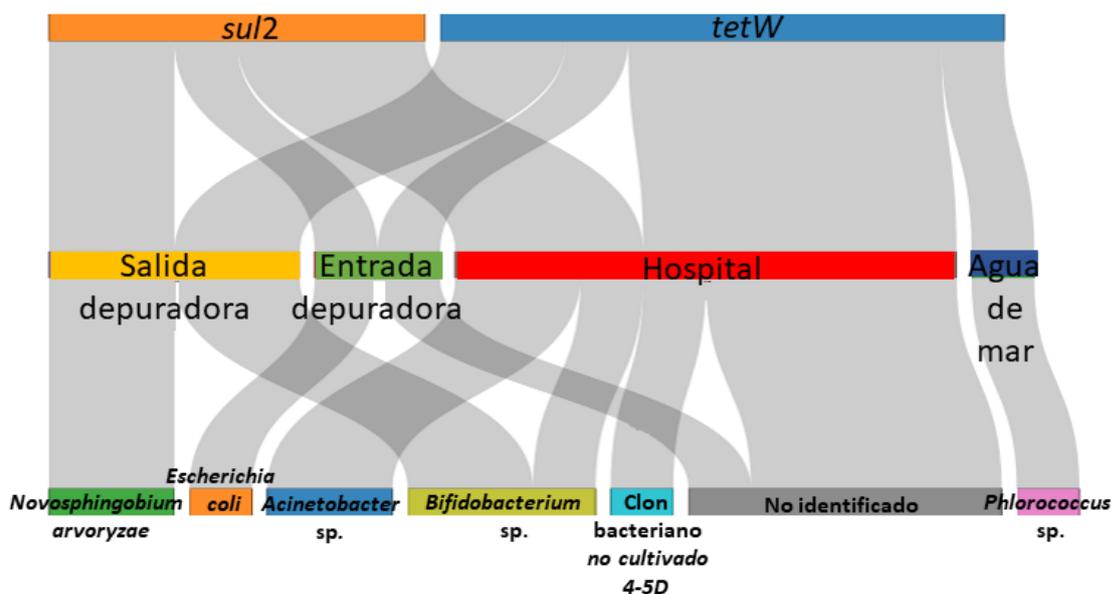


Figura 3.9. Asignación taxonómica de los contigs portadores de los GRA *sul2* y *tetW* encontrados en las aguas de entrada y salida de la depuradora, hospital y agua de mar.

3) Presencia de genes de resistencia a antibióticos en los virus de la depuradora

La monitorización de aguas residuales para el estudio de la evolución de enfermedades en la población humana ha demostrado su utilidad especialmente con la pandemia producida por el virus SARS-CoV-2 (Peccia *et al.*, 2020). En estas aguas pueden detectarse tanto virus de ADN como ARN, de manera que permiten determinar la dinámica de las enfermedades a nivel poblacional. Se ha demostrado que los virus de ADN, aunque de manera poco frecuente, pueden transportar GRA (Enault *et al.*, 2017). Sin embargo, no hemos encontrado ningún estudio que explore la posibilidad de que los GRA estén presentes en virus de ARN. El genoma de los virus de ARN suele tener un tamaño pequeño (Campillo-Balderas *et al.*, 2015) lo que explicaría la baja probabilidad de que en este se codifique un GRA.

Los virus de ARN en aguas habían sido tradicionalmente poco estudiados, hasta recientemente con la aparición de nuevos estudios que han aumentado exponencialmente la información que tenemos sobre estos virus (Callanan *et al.*, 2020; Wolf *et al.*, 2020; Zayed *et al.*, 2022). En la actualidad, hay reconocidas 7 familias de virus de ARN que infectan procariontes por el “International Committee on Taxonomy of Viruses” ó ICTV¹ (Stockdale *et al.*, 2020), entre ellas encontramos *Cystoviridae* que infectan mayoritariamente *Pseudomonas* sp. (Poranen and Mäntynen, 2017) y *Norzivirales* (antiguamente *Leviviridae*) que infectan enterobacterias (Callanan *et al.*, 2018), como por ejemplo el fago Q β , que infecta *Escherichia coli*. Ambas especies procariontes son habituales

¹ <https://talk.ictvonline.org/>. Datos extraídos: 23/05/2022.

de aguas residuales y están presentes en las aguas de hospital y depuradora analizadas en esta tesis transportando GRA (Figura 3.6), por lo que consideramos que el estudio de aguas residuales es un buen modelo para encontrar virus de ARN potencialmente portadores de GRA. Para ello, se analizaron dos puntos calientes de la dispersión de GRA como son las aguas de entrada y salida de la depuradora (Tabla 3.2).

De las aguas de entrada y salida de la depuradora se compararon los GRA presentes en los *contigs* víricos de la fracción vírica (<0,2 μm) y la fracción procariota (>0,2 μm) tanto para el ADN como para el ARN extraído. Entre un 0,81% y un 12,14% de los *contigs* fueron clasificados como virus de ARN, siendo más alto el porcentaje en las muestras víricas (<0,2 μm ; Tabla 3.7).

Tabla 3.7. *Virus de ARN detectados in silico en las muestras de entrada y salida de la depuradora.*

Muestra	Fracción	N <i>contigs</i> totales > 500 pb	N <i>contigs</i> "virus ARN"	<i>Contigs</i> "virus ARN" respecto al total (%)
Entrada depuradora	Procariota (>0,2 μm)	48186	2086	4,33
	Vírica (<0,2 μm)	6186	751	12,14
Salida depuradora	Procariota (>0,2 μm)	57427	466	0,81
	Vírica (<0,2 μm)	7568	672	8,88

En los *contigs* víricos de ARN presentes en la fracción procariota (>0,2 μm) de la entrada y salida de la depuradora no se encontró ningún GRA. De la misma manera, ninguno de los GRA encontrados en la fracción vírica (<0,2 μm ; ensamblado), pudo asociarse a un *contig* vírico de ARN (Figura 3.10), por lo que podemos decir que tanto en las aguas de la entrada como en la salida de la depuradora no hemos encontrado virus de ARN que sean portadores de GRA. A los datos obtenidos de la depuradora se comparó también los GRA/Mb encontrados en la muestra de la fracción vírica del hospital (ADN), siendo esta la que más presencia de GRA en *contigs* víricos tuvo. Por tanto, nuestros datos indican que los virus de RNA no parecen representar una amenaza como vectores de dispersión de GRA en el ecosistema.

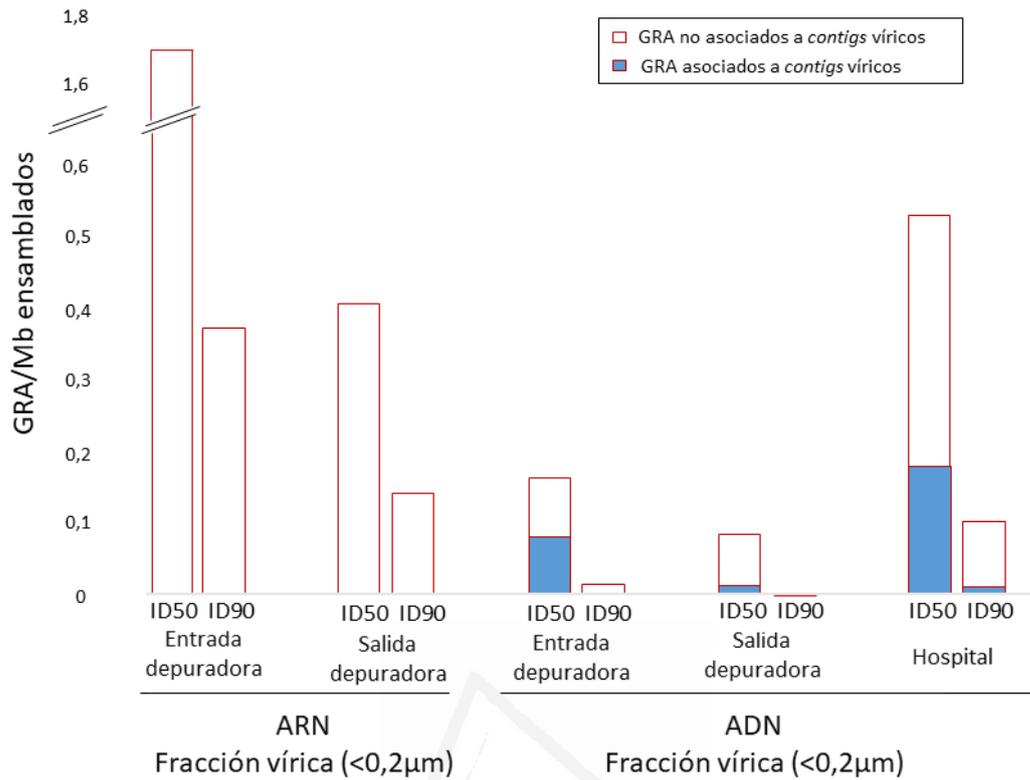


Figura 3.10. Abundancia de los genes de Resistencia a Antibióticos detectados para la fracción vírica (filtrada por $0,2\ \mu\text{m}$) ensamblada, para las muestras de ARN de la entrada y la salida de la depuradora y para las de ADN obtenidas del agua del hospital, entrada y salida de la depuradora. En blanco aquellos GRA que no se asociaron a contigs víricos detectados in silico, en azul aquellos GRA encontrados en contigs víricos.

Bibliografía

- Adriaenssens, E.M., Farkas, K., Harrison, C., Jones, D.L., Allison, H.E., and McCarthy, A.J. (2018) Viromic Analysis of Wastewater Input to a River Catchment Reveals a Diverse Assemblage of RNA Viruses. *mSystems* **3**:
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., et al. (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* **19**: 455.
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., et al. (2015) Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* **2015** **13**: 310–317.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114–2120.
- Callanan, J., Stockdale, S.R., Shkoporov, A., Draper, L.A., Ross, R.P., and Hill, C. (2020) Expansion of known ssRNA phage genomes: From tens to over a thousand. *Sci Adv* **6**:
- Callanan, J., Stockdale, S.R., Shkoporov, A., Draper, L.A., Ross, R.P., and Hill, C. (2018) RNA Phage Biology in a Metagenomic Era. *Viruses* **2018**, Vol 10, Page 386 **10**: 386.
- Campillo-Balderas, J.A., Lazcano, A., and Becerra, A. (2015) Viral genome size distribution does not correlate with the antiquity of the host lineages. *Front Ecol Evol* **3**: 143.
- Caniaux, I., van Belkum, A., Zambardi, G., Poirel, L., and Gros, M.F. (2017) MCR: modern colistin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **36**: 415–420.
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B., and Petit, M.-A. (2017) Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J* **11**: 237–247.
- Gibson, M.K., Forsberg, K.J., and Dantas, G. (2015) Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J* **9**: 207–16.
- Gu, W., Talevich, E., Hsu, E., Qi, Z., Urisman, A., Federman, S., et al. (2021) Detection of cryptogenic malignancies from metagenomic whole genome sequencing of body fluids. *Genome Med* **13**: 1–11.
- Guo, J., Bolduc, B., Zayed, A.A., Varsani, A., Dominguez-Huerta, G., Delmont, T.O., et al. (2021) VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome* **9**:
- Gupta, S.K., Padmanabhan, B.R., Diene, S.M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., and Rolain, J.-M. (2014) ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 212–220.
- Hassoun-Kheir, N., Stabholz, Y., Kreft, J.-U., De La Cruz, R., Romalde, J.L., Nesme, J., et al. (2020) Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Sci Total Environ* **743**: 140804.
- He, P., Wu, Y., Huang, W., Wu, X., Lv, J., Liu, P., et al. (2020) Characteristics of and variation in airborne ARGs among urban hospitals and adjacent urban and suburban communities: A metagenomic approach. *Environ Int* **139**: 105625.
- Hendriksen, R.S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., et al. (2019)

- Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun* 2019 101 **10**: 1–12.
- Hu, B., Tao, Y., Shao, Z., Zheng, Y., Zhang, R., Yang, X., et al. (2021) A Comparison of Blood Pathogen Detection Among Droplet Digital PCR, Metagenomic Next-Generation Sequencing, and Blood Culture in Critically Ill Patients With Suspected Bloodstream Infections. *Front Microbiol* **12**: 1056.
- Hu, Y., Yang, X., Qin, J., Lu, N., Cheng, G., Wu, N., et al. (2013) Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat Commun* **4**: 1–7.
- Huang, J.J., Hu, H.Y., Lu, S.Q., Li, Y., Tang, F., Lu, Y., and Wei, B. (2012) Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environ Int* **42**: 31–36.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W., and Hauser, L.J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**: 119.
- Ishii, S. (2020) Quantification of antibiotic resistance genes for environmental monitoring: Current methods and future directions. *Curr Opin Environ Sci Heal* **16**: 47–53.
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., et al. (2017) CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* **45**: D566–D573.
- Jiang, H., Cheng, H., Liang, Y., Yu, S., Yu, T., Fang, J., and Zhu, C. (2019) Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in *Escherichia coli* Isolates From *Penaeus vannamei* and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Front Microbiol* **10**: 1787.
- Karkman, A., Pärnänen, K., and Larsson, D.G.J. (2019) Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat Commun* **10**.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.I., and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**: 3059–3066.
- Kunhikannan, S., Thomas, C.J., Franks, A.E., Mahadevaiah, S., Kumar, S., and Petrovski, S. (2021) Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. *Microbiologyopen* **10**.
- Lee, J.H. (2003) Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6489.
- Li, B., Yang, Y., Ma, L., Ju, F., Guo, F., Tiedje, J.M., and Zhang, T. (2015) Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME J* 2015 911 **9**: 2490–2502.
- Manaia, C.M., Macedo, G., Fatta-Kassinos, D., and Nunes, O.C. (2016) Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 1543–1557.
- McMullen, A., Martinez-Hernandez, F., and Martinez-Garcia, M. (2019) Absolute quantification of infecting viral particles by chip-based digital polymerase chain reaction. *Environ Microbiol Rep* **11**: 855–860.
- Menzel, P., Ng, K.L., and Krogh, A. (2016) Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun* 2016 71 **7**: 1–9.

- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G.A., Sonnhammer, E.L.L., et al. (2021) Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res* **49**: D412–D419.
- Pärnänen, K.M.M., Narciso-Da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T.U., Cacace, D., Do, T.T., et al. (2019) Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci Adv* **5**:
- Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D.E., Grubaugh, N.D., Kaplan, E.H., Casanovas-Massana, A., et al. (2020) Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat Biotechnol* **38**: 1164–1167.
- Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P., and Frey, J. (2005) Microarray-Based Detection of 90 Antibiotic Resistance Genes of Gram-Positive Bacteria. *J Clin Microbiol* **43**: 2291.
- Poranen, M.M. and Mäntynen, S. (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Cystoviridae. *J Gen Virol* **98**: 2423.
- Quan, P.L., Sauzade, M., and Brouzes, E. (2018) DPCR: A technology review. *Sensors (Switzerland)* **18**:
- R Core Team (2007) R: A language and environment for ## statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., et al. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci Total Environ* **447**: 345–360.
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sanchez-Melsi, A.S., et al. (2014) Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river.
- Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., et al. (2020) Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environ Int* **140**: 105733.
- Roux, S., Páez-Espino, D., Chen, I.M.A., Palaniappan, K., Ratner, A., Chu, K., et al. (2021) IMG/VR v3: an integrated ecological and evolutionary framework for interrogating genomes of uncultivated viruses. *Nucleic Acids Res* **49**: D764–D775.
- Stockdale, C.J., Adriaenssens, E.M., Kuhn, J.H., Pallen, M., Rumnieks, J., Shkoporov, A., et al. (2020) Rename one class (Leviviricetes - formerly Allasoviricetes), rename one order (Norzivirales - formerly Levivirales), create one new order (Timlovirales), and expand the class to a total of six families, 420 genera and 883 species. *Int Comm Taxon Viruses*.
- Thakali, O., Malla, B., Raya, S., Sthapit, N., Sherchan, S.P., Furukawa, T., et al. (2022) Prevalence of antibiotic resistance genes in drinking water of the Kathmandu Valley, Nepal. *Environ Challenges* **7**: 100527.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2014) Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 761–778.
- Wang, H., Wang, N., Wang, B., Zhao, Q., Fang, H., Fu, C., et al. (2016) Antibiotics in Drinking Water in Shanghai and Their Contribution to Antibiotic Exposure of School Children. *Environ Sci Technol* **50**: 2692–2699.

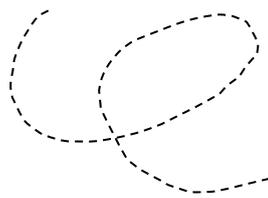
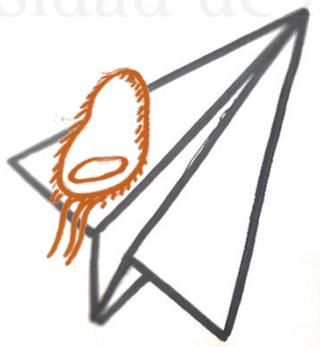
- Wang, Z., Chen, Q., Zhang, J., Guan, T., Chen, Y., and Shi, W. (2020) Critical roles of cyanobacteria as reservoir and source for antibiotic resistance genes. *Environ Int* **144**: 106034.
- Williams, M. (2014) How Much Water is There on Earth? | U.S. Geological Survey. 10–12.
- Wolf, Y.I., Silas, S., Wang, Y., Wu, S., Bocek, M., Kazlauskas, D., et al. (2020) Doubling of the known set of RNA viruses by metagenomic analysis of an aquatic virome. *Nat Microbiol* **2020** *5*: 1262–1270.
- Yang, D., Heederik, D.J.J., Scherpenisse, P., Van Gompel, L., Luiken, R.E.C., Wadepohl, K., et al. (2022) Antimicrobial resistance genes aph(3')-III, erm(B), sul2 and tet(W) abundance in animal faeces, meat, production environments and human faeces in Europe. *J Antimicrob Chemother*.
- Yang, F., Gao, Y., Zhao, H., Li, J., Cheng, X., Meng, L., et al. (2021) Revealing the distribution characteristics of antibiotic resistance genes and bacterial communities in animal-aerosol-human in a chicken farm: From One-Health perspective. *Ecotoxicol Environ Saf* **224**: 112687.
- Zayed, A.A., Wainaina, J.M., Dominguez-Huerta, G., Pelletier, E., Guo, J., Mohssen, M., et al. (2022) Cryptic and abundant marine viruses at the evolutionary origins of Earth's RNA virome. *Science (80-)* **376**: 156–162.
- Zhang, A.N., Gaston, J.M., Dai, C.L., Zhao, S., Poyet, M., Groussin, M., et al. (2021) An omics-based framework for assessing the health risk of antimicrobial resistance genes. *Nat Commun* **2021** *12*: 1–11.
- Zhang, D., Peng, Y., Chan, C.L., On, H., Wai, H.K.F., Shekhawat, S.S., et al. (2021) Metagenomic Survey Reveals More Diverse and Abundant Antibiotic Resistance Genes in Municipal Wastewater Than Hospital Wastewater. *Front Microbiol* **12**: 2378.
- Zhang, S., Huang, J., Zhao, Z., Cao, Y., and Li, B. (2020) Hospital Wastewater as a Reservoir for Antibiotic Resistance Genes: A Meta-Analysis. *Front Public Heal* **8**: 679.
- Zhang, S.X., Zhang, Q.Q., Liu, Y.S., Yan, X.T., Zhang, B., Xing, C., et al. (2020) Emission and fate of antibiotics in the Dongjiang River Basin, China: Implication for antibiotic resistance risk. *Sci Total Environ* **712**: 136518.

CAPÍTULO 4

Explorando el aire como vector abiótico de dispersión de genes de resistencia a antibióticos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Introducción

Los aerosoles son una suspensión de partículas inorgánicas y orgánicas generalmente entre 0,001 y 100 μm , cuyo pequeño tamaño les permite mantenerse en el aire durante largos períodos de tiempo e incluso viajar grandes distancias (Hervàs *et al.*, 2009). Dentro de la fracción orgánica de los aerosoles, encontramos los bioaerosoles, que generalmente se definen como organismos vivos, muertos, debris o subproductos de la actividad biológica (Georgakopoulos *et al.*, 2009). Por tanto, se incluyen en la definición de bioaerosoles o aerosoles biológicos a los microorganismos como bacterias, hongos, arqueas u otras partículas como polen, virus o sus fragmentos, componentes o subproductos como toxinas o ADN (Mainelis, 2020).

El estudio de los bioaerosoles ha ido adquiriendo gran importancia a lo largo de los años, ya que se ha descubierto que estos están implicados en numerosos procesos como la formación de nubes actuando como núcleos de condensación (Bauer *et al.*, 2003), en la transmisión de enfermedades vegetales (Smith *et al.*, 2019), entre el ganado (Stärk, 1999) y sobre todo por su impacto en la salud humana (Kim *et al.*, 2018), cobrando especial importancia en la actualidad, ya que es una de las principales vías de transmisión del SARS-CoV-2 (Greenhalgh *et al.*, 2021), a través de la inhalación de los aerosoles producidos al toser, estornudar o respirar por parte de una persona infectada.

La metodología del estudio de los microorganismos presentes en el aire puede dividirse en dos grandes grupos: muestreo pasivo y muestreo activo. En el muestreo pasivo se emplean placas Petri con medio de cultivo sólido que se exponen al aire durante un tiempo determinado. En estas crecen algunas de las partículas biológicas que sedimentan en la misma, haciéndose el recuento como Unidades Formadoras de Colonias/ m^2 /hora (Napoli *et al.*, 2012). En los muestreos activos el aire se aspira de manera controlada mediante su bombeo y las partículas presentes en éste pasan a un medio de recolección. Este medio de recolección puede ser líquido como en el caso de los muestreadores conocidos como “impigners” o “ciclónicos”, o bien puede ser sólido, por ejemplo, siendo una membrana de nitrocelulosa en el caso de los muestreadores activos conocidos como “filtros” o en medio agar sólido o semi-sólido en el caso de los “impactadores” (Haig *et al.*, 2016).

Uno de los grandes problemas de los muestreos basados en medios de cultivo para el estudio de poblaciones microbianas (por ejemplo, placas Petri) es que están basados en el crecimiento de los microorganismos para su estudio, y éstos muchas veces no podrán crecer por no tener las condiciones adecuadas (problema conocido como “gran anomalía de recuento en placa” (Staley and Konopka, 1985), por lo que no reflejan adecuadamente la complejidad de la población microbiana. Para solventar este problema, se recurre al estudio de la población microbiana empleando métodos no basados en cultivo, como la metagenómica. En ésta se extrae el ADN de una muestra recolectada y posteriormente se secuencian, obteniendo información de los microorganismos presentes en esta, independientemente de si son o no capaces de crecer en un medio de cultivo.

El muestreador de aire Coriolis μ (Figura 4.1, Bertin Instruments, Francia) es un muestreador activo del tipo ciclónico. Se denomina así porque en el medio líquido que se añade al cono de recolección se genera un vórtex o corriente en espiral (ciclónica) que permite la transferencia de las partículas que hay en el aire a la muestra acuosa, expulsando al exterior el aire sin estas partículas. Las partículas retenidas (bacterias, arqueas, hongos, virus, esporas, fragmentos o componentes de estos) quedan en el medio líquido a partir del cual se puede extraer el ADN de los microorganismos presentes en ésta.

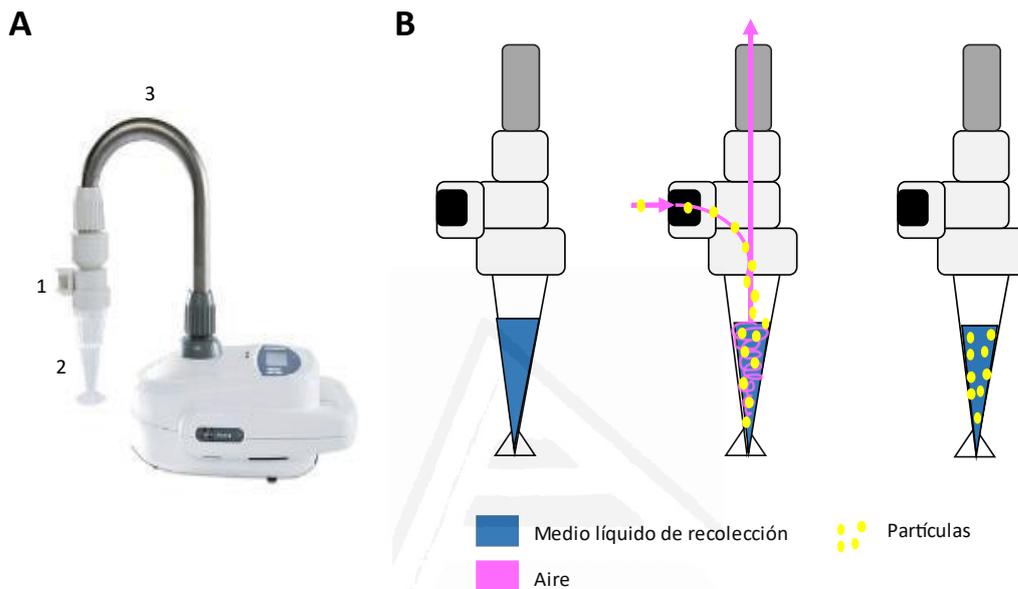


Figura 4.1. Imagen del Coriolis μ , donde están marcadas la boquilla por la que se absorbe el aire (1), el cono de recolección con medio líquido (2) y el cuello o tubería por dónde se expulsa el aire sin partículas (A). En el panel B se puede apreciar el detalle del funcionamiento del mismo: Primero se pone el cono estéril con el medio líquido (azul), después se absorbe el aire (rosa) que contiene las partículas (amarillo) y éstas se van quedando en el líquido gracias a la corriente ciclónica generada dentro del cono. El aire libre de partículas es expulsado a través del cuello y fuera del aparato. Imagen A extraída de <https://www.bertin-instruments.com/product/air-samplers/coriolis-micro-air-sampler>

La presencia de bacterias en el aire implica que estas pueden tener codificado en su material genético algún gen de resistencia a antibióticos. Dada la emergencia global existente respecto al incremento de resistencias (Ventola, 2015), cada vez hay más estudios que analizan la presencia de GRA en el aire (también llamado resistoma) o sus portadores (Figura 4.2) especialmente en el área clínica (Wu *et al.*, 2022), pero también en otros ambientes como en el transporte público (metro) (Zhou and Wang, 2013), guarderías (Li *et al.*, 2020), granjas (Yang *et al.*, 2021) y depuradoras (Yang *et al.*, 2022).



Figura 4.2. Número de publicaciones anuales que corresponden a la búsqueda en PubMed (NCBI) de “Antibiotic Resistance” + “air”. Datos extraídos el 03/02/22 y comprendidos entre 1957 y 2022. Los resultados obtenidos fueron curados manualmente, leyendo el resumen de los artículos y eliminando aquellos que no estaban relacionados con el estudio de GRA y microorganismos resistentes en el aire.

En su mayoría hay estudios que se dedican a la detección de uno o varios genes de resistencia de interés a partir del empleo de PCR convencional (Zhou and Wang, 2013; Li *et al.*, 2016) o bien a su cuantificación empleando qPCR (Li *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021) o ddPCR (Gao *et al.*, 2018). Más recientemente empiezan a surgir estudios que emplean la metagenómica para el análisis del resistoma del aire (Cao *et al.*, 2014; He *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2022).

Objetivos

En este capítulo estudiamos la potencial dispersión de genes de resistencia a antibióticos a través del aire en distintos puntos de la ciudad de Alicante. Para ello planteamos distintos objetivos:

- 1) Caracterización microbiana presente en bioaerosoles de muestras del aire de la terraza y recepción del Hospital General de Alicante y de distintas localizaciones en la depuradora de referencia de la ciudad de Alicante (L’Alacantí Nord) tanto *in situ*, a favor y en contra de viento en la depuradora.
- 2) Estudio, caracterización y comparativa del resistoma aéreo en ambientes de alta dispersión de GRA del Hospital General de Alicante y la depuradora.
- 3) Análisis de la potencial dispersión de GRA por el aire desde la depuradora a otros lugares. Identificación de los GRA y portadores comunes entre los focos calientes de dispersión y otros ambientes.

Descripción del Experimento

Lugar de muestreo

Para la obtención de muestras de aire se empleó el muestreador Coriolis μ (Bertin instruments) cedido por la Dra. Elena González Torill (INTA-CSIC). Este muestreador se puede emplear tanto para la toma de muestras en interior como en exteriores, siendo capaz de captar las partículas presentes en el aire y haciéndolas pasar al medio líquido presente en el cono, lo que permite superar los límites de los métodos tradicionales de análisis de aire basados en cultivo.

Se conocen como puntos calientes de dispersión de GRA aquellos lugares dónde hay una alta concentración de GRA y por tanto altas probabilidades de que éstos se dispersen. Ejemplos de esto son los hospitales (Wu *et al.*, 2022), dónde más antibióticos se prescriben, y las depuradoras a las que llegan diferentes antibióticos cuyas concentraciones podrían fomentar la aparición de resistencias (Rizzo *et al.*, 2013). Para este experimento se muestrearon dos puntos calientes de la dispersión de genes de resistencia a antibióticos:

1) la depuradora L' Alacantí Nord (38°25'33.7"N 0°25'08.1"W) donde se muestrearon tres puntos o localizaciones de muestreo: 1.1) en el propio recinto de la depuradora, que llamaremos *in situ*, 1.2.) en un punto a pocos metros del recinto de la depuradora situado a favor del viento, y 1.3) y otro punto muy cercano a la depuradora, pero en contra del viento (ver figura 4.3A para la localización exacta). Para explorar la dispersión de GRA por parte del viento en la depuradora se analizaron 3 puntos que son clave: en contra de viento, es decir, viento procedente del mar que no ha pasado por la depuradora (depuradora en contra), en el reactor biológico de la misma (depuradora *in situ*) y a favor de viento (depuradora a favor), para comprobar si el viento que pasa por el reactor biológico es capaz de transportar GRA provenientes del mismo.

2) Hospital General de Alicante (38°21'47.9"N, 0°29'08.6"W), donde se muestrearon dos puntos: 2.1) en la recepción y 2.2) en la salida de un extractor del hospital situado en una terraza del mismo (Figura 4.3 B).

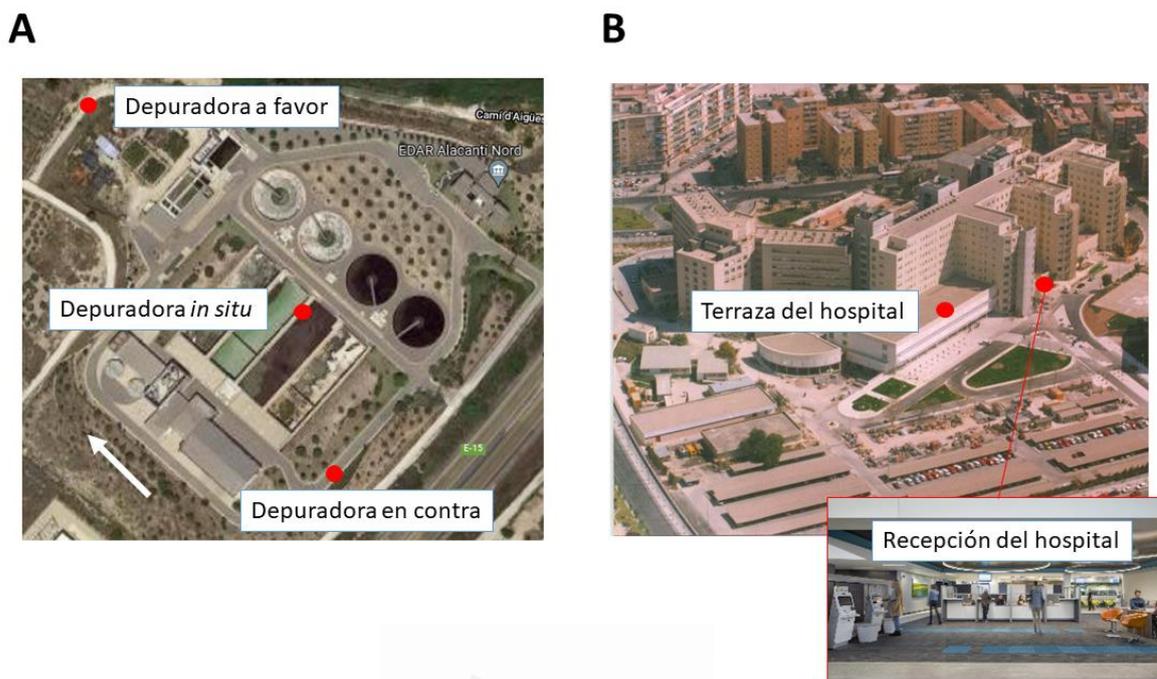


Figura 4.3. Puntos de muestreo de aire. En el panel A se puede observar el muestreo exterior realizado en la depuradora L'Alacantí Nord (A). Se muestrearon 3 puntos distintos: en contra del viento (Depuradora en contra), in situ en la depuradora, situado sobre el reactor biológico (Depuradora in situ) y a favor de viento (Depuradora a favor). En blanco se puede observar la flecha indicando la dirección del viento. En el panel B se pueden observar los dos puntos de muestreo situados en el Hospital General de Alicante, uno en una de las terrazas donde estaba situado un extractor de aire (Terraza del hospital) y el otro en el interior de la recepción del hospital (Recepción del hospital). Imagen A obtenida de <https://www.google.es/maps>. Imagen B obtenida de <http://alicante.san.gva.es/galeria-de-imagenes>.

En la depuradora se midieron también la temperatura, velocidad y dirección del viento empleando un anemómetro (Mingtech Wireless Weather Station).

Como control negativo se muestreó el aire presente en campana de flujo con esta en funcionamiento durante 4 horas con el Coriolis μ dentro, siguiendo el mismo procedimiento que con las otras muestras.

Muestreo y procesado de las muestras

En periodos de diez minutos, la alta tasa de succión (hasta 300 L/min) junto a la llamada tecnología ciclónica, en la que en el medio presente en el cono se genera una corriente en espiral (o vórtex), permiten la transferencia de partículas que hay en el aire a un *buffer* de elección. Como *buffer* para muestrear se empleó PBS (1x, pH 7) previamente autoclavado. El volumen del cono se rellenó siempre tras transcurrir los 10 minutos hasta un volumen máximo de 10 mL para evitar la evaporación del medio (Behzad *et al.*, 2015).

Previo a cada muestreo se esterilizó la boquilla, cuello del Coriolis, conos y tapas. Para eliminar cualquier contaminación que hubiese podido quedar en la boquilla o cuello del Coriolis, para cada una de las muestras los primeros 10 minutos de muestreo se recogieron

en un cono distinto al de la muestra y se desecharon. Mientras que el resto de tiempo se recogió la muestra en el mismo cono. Una vez recogida la muestra en el cono, esta se tapó y se transportó en hielo (4°C) al laboratorio. Una vez en el laboratorio, la muestra se filtró empleando filtros de 0,2 µm (Isopore Membrane Filters, Ref. GTTP02500) y el eluido del filtrado previo se volvió a filtrar por filtros de 0,02 µm (Anodisc Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Ref. 6809-6002), a estas muestras las nombraremos como víricas o muestras de virus. Ambos filtros se congelaron a -80°C hasta su procesamiento. El ADN de todas las muestras se extrajo empleando el kit DNAeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Ref. 47014) como especifica la casa comercial.

La concentración de ADN extraído se midió con Qubit y el kit HS dsDNA Qubit (Thermo Fisher Scientific, Ref. Q32851). Ante la imposibilidad de obtener librerías empleando metodologías convencionales que funcionaron en otras muestras de esta misma tesis (Nextera XT, Illumina) las librerías se realizaron empleando la metodología de Rinke et al. (2016) en la que se reduce la concentración de tagmentasa (1/10) respecto a la original, se emplean 20 ciclos de PCR y la resuspensión final se realiza en 20 µL. En este paso, se añadió un control negativo que consistió en la realización de una librería de ADN del fago lambda (500 µg/mL; BioLabs, Ref. N3011S) cuyas lecturas se emplearon para limpiar las de las muestras obtenidas como especifica Rinke *et al.* (2016).

El ADN de las muestras de las que no se pudieron hacer librerías empleando la metodología de Rinke (Rinke *et al.*, 2016), se amplificó utilizando la amplificación de desplazamiento múltiple comúnmente conocida como MDA por sus siglas en inglés, que había sido previamente aplicada en estudios de genómica de célula o virus individuales, demostrando su efectividad para la amplificación de ADN en bajas cantidades (Martinez-Hernandez *et al.*, 2017; De La Cruz Peña *et al.*, 2018). Las librerías para las muestras amplificadas por MDA fueron entonces realizadas empleando Nextera XT (Illumina, Ref. FC-131-1024) como indica el fabricante. Otro de los controles negativos añadidos fue la amplificación por MDA de agua miliQ para la eliminación bioinformática de aquellas lecturas debidas a la presencia de ADN contaminante potencialmente presente en los reactivos empleados durante el proceso de MDA.

Las librerías se secuenciaron en Macrogen (Seoul, Rep. de Corea) con Illumina Hiseq X que dio lecturas pareadas (*paired-end*) de 150 pb. Se emplearon una carrera y media de secuenciación para todas las muestras (110 Gb/carrera).

Para la comprobación del funcionamiento del Coriolis se filtró el aire de la depuradora de L'Alacantí Nord y una parte de éste se tiñó con SYBR-Gold (ThermoFisher Scientific, REF. S11494) y se observó con microscopía para comprobar la existencia de microorganismos en la muestra.

Análisis bioinformático

Una vez recibidas las muestras secuenciadas, se eliminaron las secuencias que correspondían a los cebadores y también lecturas de baja calidad empleando Trimmomatic

(Bolger *et al.*, 2014). Los metagenomas obtenidos se compararon empleando MetaFast (Ulyantsev *et al.*, 2016).

Posteriormente, se realizó la limpieza de lecturas con los controles negativos antes mencionados, eliminando toda lectura de las muestras cuya cobertura fuera $\geq 50\%$ e identidad $\geq 80\%$ respecto a los controles. Las muestras de la depuradora filtradas por 0,2 μm (3 en total) y la de la recepción del hospital se limpiaron con el control negativo del fago lambda (obtenido con Rinke *et al.*, 2016) y las muestras obtenidas por MDA (terrazza del hospital y virus de la terraza del hospital) se limpiaron con el control de agua miliQ al que se le aplicó el mismo proceso metodológico. Una vez eliminadas las lecturas consideradas como contaminación, se reagruparon como emparejadas y no emparejadas (*paired* y *unpaired*) y se procedió a ensamblarlas empleando SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) (-meta, configuración por detecto). En el caso de que una de las dos lecturas emparejadas fuera similar a los controles negativos se eliminaron ambas lecturas para análisis posteriores.

Tras ensamblar las lecturas, los fragmentos genómicos o *contigs* obtenidos con una longitud superior a 500 pares de bases (bp) fueron analizados mediante prodigal (Hyatt *et al.*, 2010) que detectó los marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) y posteriormente los tradujo a proteínas.

Tanto las lecturas como las proteínas obtenidas de las secuencias ensambladas se emplearon para estudiar los GRA presentes en estas mediante la comparación usando BLAST con 3 bases de datos de GRA: CARD (Jia *et al.*, 2017), RESFAMS (Gibson *et al.*, 2015) y ARG_ANNOT (Gupta *et al.*, 2014). Como criterio para considerar la presencia de un GRA en los datos, se consideró únicamente el mejor hit (*best-hit*) que tuviera un *bit-score* ≥ 70 e identidades proteicas $\geq 50\%$ y $\geq 90\%$ con las bases de datos usadas. En ocasiones, los genes esenciales o constitutivos (en inglés *housekeeping*) pueden presentar mutaciones puntuales que los hacen resistentes a antibióticos por lo que están recogidos en las bases de datos de GRA usadas, sin embargo, todos estos fueron descartados del análisis ya que los filtros usados podían incluirlos a pesar de ser falsos positivos (Capítulo 1 de la Tesis). Los GRA se agruparon por la clase de antibiótico al que otorgan resistencia según CARD (Jia *et al.*, 2017).

Para poder comparar la abundancia de GRA entre muestras, éstas se normalizaron dividiendo el número de hits por las Megabases (Mb) de las lecturas en la parte sin ensamblar o por el número de rRNA 16S encontrados. En el caso de los datos ensamblados, se dividió por los Mb de los *contigs* obtenidos. Esta normalización se aplicó únicamente a aquellas muestras para las que no se empleó MDA, ya que en este caso la MDA puede alterar las proporciones relativas originales de los fragmentos de DNA, afectando por tanto a los valores de abundancia de GRA (Yilmaz *et al.*, 2010).

La anotación taxonómica para las lecturas no ensambladas se realizó empleando Kaiju (Menzel *et al.*, 2016) empleando la base de datos nr_euk que contiene proteínas pertenecientes a arqueas, bacterias, virus, hongos y eucariotas microbianos. De aquellas lecturas que no pudieron ser clasificadas por el programa, se extrajo un subconjunto (1-2%

del total de la muestra, siempre un mínimo de 20000 lecturas) y se compararon con la base de datos *nt* de NCBI (2021) para su clasificación. En el caso de la taxonomía de la parte ensamblada, se extrajeron aquellos fragmentos genómicos o *contigs* que tenían al menos un GRA y se analizaron con Kaiju (Menzel *et al.*, 2016), comparándolos con la base de datos *nr_euk*.

Para la detección de *contigs* víricos en aquellos *contigs* con al menos un GRA se empleó VirSorter2 (Guo *et al.*, 2021), considerándose como *contigs* víricos únicamente aquellos con una puntuación máxima (o *max. score*) $\geq 0,9$.

Resultados y Discusión

1) Microscopía de fluorescencia

La presencia de microorganismos en la muestra de aire tomada con el muestreador Coriolis μ durante 2 horas en la depuradora de L'Alacantí Nord fue demostrada con una tinción SYBR-Gold (ThermoFisher Scientific, REF. S11494), un fluorocromo que se une a ácidos nucleicos (Figura 4.4).

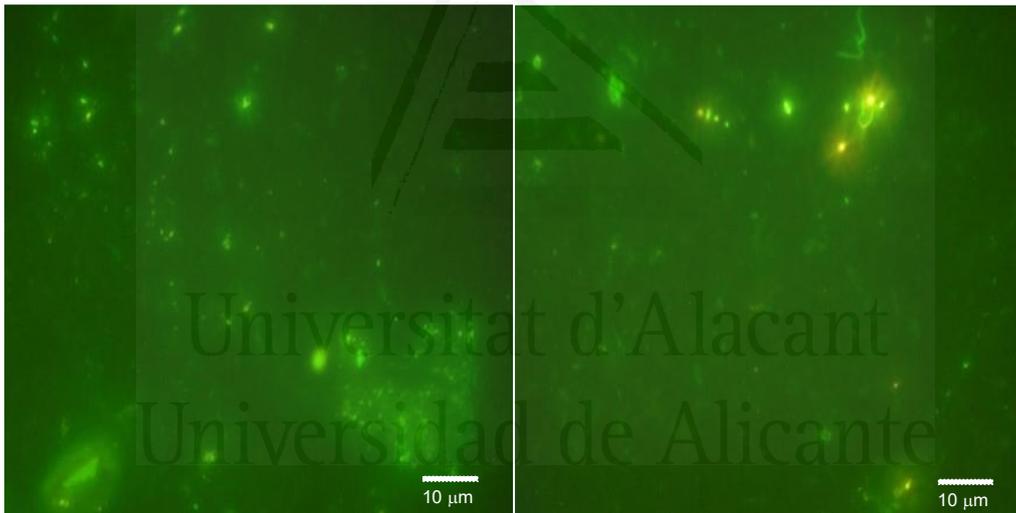


Figura 4.4. Tinción SYBR-Gold de una muestra de aire obtenida tras 2 horas de succión de aire (300L/min) donde se puede apreciar la presencia de microorganismos. La muestra fue recogida en PBS (1x, Ph 7) y posteriormente filtrada empleando un filtro de 0.2 μm . La tinción se realizó sobre el filtro. La imagen fue tomada con microscopía de epifluorescencia con el objetivo de inmersión (100x).

2) Toma de muestras y controles

Como control negativo se empleó el Coriolis μ dentro de una campana de flujo en funcionamiento durante 4 horas tal y como se tomaron el resto de las muestras. Se realizó una extracción de ADN, pero no se obtuvo ADN, o bien, su concentración fue extremadamente baja para su detección con HS dsDNA Qubit (Thermo Fisher Scientific, Ref. Q32851). En una última prueba, se trató de amplificar el ADN obtenido empleando MDA pero no se obtuvo ningún resultado. Estos datos indican que el proceso empleado

para la obtención de muestra y extracción de ADN de la misma no introducen una contaminación significativa detectable.

Una vez comprobados que el control negativo y el positivo funcionaron correctamente, se procesaron las siguientes muestras de aire:

Tabla 4.1. Muestras de aire procesadas en esta tesis.

Muestras Aire ¹	Fecha	Tiempo Muestreo (horas)	Vol. Aire filtrado (m ³)	Vel. Viento (km/h)	Concentración ADN (ng/uL) ²	ADN total extraído (ng)	Librería/ Amplif. ³
Recepción del hospital	22/10/19	6h	108	/	P 0,08	8,02	Rinke et al.
Depuradora <i>in situ</i>	27/05/20	3 h 30'	60	21±5	P 0,07	5,09	Rinke et al.
					V DB		AMD y 12x
Depuradora en contra	11/7/20	3 h 30'	60	15±6	P 0,05	4	Rinke et al.
Depuradora a favor	12/7/20	3 h 30'	60	12±3	P 0,16	12,52	Rinke et al.
Terraza del hospital	14/7/20	2h55'	52,5	/	P 0,07	0,72	AMD y 12x
					V DB		AMD y 12x

¹ En esta tabla se presentan las muestras de aire procedentes de 5 lugares diferentes (dos en el Hospital de Alicante y 3 en la depuradora de L'Alacantí Nord).

² P (procariotas) indica que la muestra fue obtenida de un filtro de 0,2 µm (fracción >0,2 µm), mientras que la V (virus) indica que ésta fue obtenida del filtrado obtenido, que quedó retenido en un filtro de 0,02 µm (fracción <0,2 µm).

³ "Rinke et al." hace referencia a que se siguió el protocolo propuesto por el autor (Rinke et al., 2016) para la realización de librerías y "AMD y 12x" si el ADN obtenido se amplificó mediante Amplificación de Desplazamiento Múltiple (MDA) y posterior librería convencional de 12 ciclos.

El lugar dónde más ADN se recogió por m³ de aire muestreado fue en la depuradora a favor de aire (208 pg/m³) seguido por el reactor biológico de la misma (de aquí en adelante, depuradora *in situ*) con 85 pg/m³, en órdenes similares se encontraron la muestra de la recepción del hospital (74 pg/m³) y la depuradora en contra del viento (66 pg/m³). Finalmente, de la que menos ADN se extrajo fue de la terraza del hospital (14 pg/m³) un valor muy similar al valor medio de ADN extraído de una terraza de hospital de San Diego, Estados Unidos (16 pg/m³) a pesar de que éste muestreo se realizó durante 3 días empleando muestreador activo del tipo "filtro" (100L/min) (King et al., 2016).

Una de las consideraciones más importantes cuando se preparan librerías para la secuenciación partiendo de una cantidad de ADN baja es la contaminación (Rinke *et al.*, 2016). Se ha descrito que durante el procesamiento de la muestra con el empleo de kits y otros reactivos usados en el laboratorio se introducen contaminantes, como ADN exógeno, que pueden afectar los resultados de la secuenciación (Salter *et al.*, 2014). De hecho, hay

hasta 181 géneros de bacterias reconocidos como contaminantes de kits de extracción de ADN usados comúnmente (Glassing *et al.*, 2016). Éste es un problema negligible en el contexto de librerías de ADN que parten de una biomasa microbiana o concentración estándar, pero puede suponer un grave problema para aquellas librerías cuya concentración de inicio es muy baja debido a la baja biomasa presente inicialmente en la muestra (Salter *et al.*, 2014; Rinke *et al.*, 2016).

Por ello, además de las muestras arriba presentadas, se prepararon tres controles negativos que se emplearían posteriormente para la limpieza bioinformática de los datos obtenidos. El primer control negativo ya mencionado fue el empleo de Coriolis μ dentro de una campana de flujo, del que no se consiguió amplificar el ADN. Otro de los controles negativos aplicados fue realización de la librería y posterior secuenciación según el método de Rinke *et al.* (2016) de ADN del fago lambda, empleado para filtrar las lecturas secuenciadas de las muestras procesadas igual (recepción del hospital y las tres de depuradora obtenidas del filtro de 0,2 μ m). Finalmente, el último control negativo fue la amplificación de agua mili-Q empleando AMD y la realización de una librería Nextera XT de manera convencional (12 ciclos).

3) Secuenciación, limpieza y comparativa frente a negativos con datos sin ensamblar

Una vez obtenidas las secuencias en crudo (HiSeqX, 2x150pb; Tabla 4.2) se procedieron a su tratamiento bioinformático con diferentes herramientas. En total, se analizaron 40 Gb de datos de secuenciación a partir de muestras de aire (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Limpieza bioinformática inicial de las muestras y controles obtenidos.

Muestra/Control	Gb iniciales	Número de lecturas inicial	Número de lecturas tras uso Trimmomatic	de Lecturas eliminadas por de Trimmomatic (%)
Lambda (control negativo)	41,94	2,78x10 ⁸	2,13x10 ⁸	23,24
Mili-Q (control negativo)	32,05	2,12x10 ⁸	1,93x10 ⁸	9,01
Depuradora <i>in situ</i>	2,61	1,73x10 ⁷	1,49x10 ⁷	13,80
Virus depuradora <i>in situ</i>	0,62	4,10x10 ⁶	3,77x10 ⁶	8,20
Depuradora en contra	0,52	3,42x10 ⁶	3,15x10 ⁶	7,67
Depuradora a favor	0,20	1,30x10 ⁶	1,19x10 ⁶	8,64
Recepción del hospital	3,93	2,61x10 ⁷	2,11x10 ⁷	18,87
Terraza del hospital	31,08	2,06x10 ⁸	1,86x10 ⁸	9,88
Virus terraza del hospital	0,61	4,04x10 ⁶	3,62x10 ⁶	10,50

Para la limpieza inicial se empleó el programa Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) que elimina lecturas de baja calidad, así como los cebadores usados en las librerías. Esta primera limpieza eliminó por muestra aproximadamente un 12% de las lecturas totales (Tabla 4.2). Con las lecturas procesadas por Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) se procedió a comparar las muestras entre ellas y con sus controles empleando MetaFast (Ulyantsev *et al.*, 2016) (Figura 4.5) que indicó una distancia grande ($>0,88$) entre parejas de muestras, por tanto, existen diferencias entre las muestras analizadas y sus respectivos controles negativos.

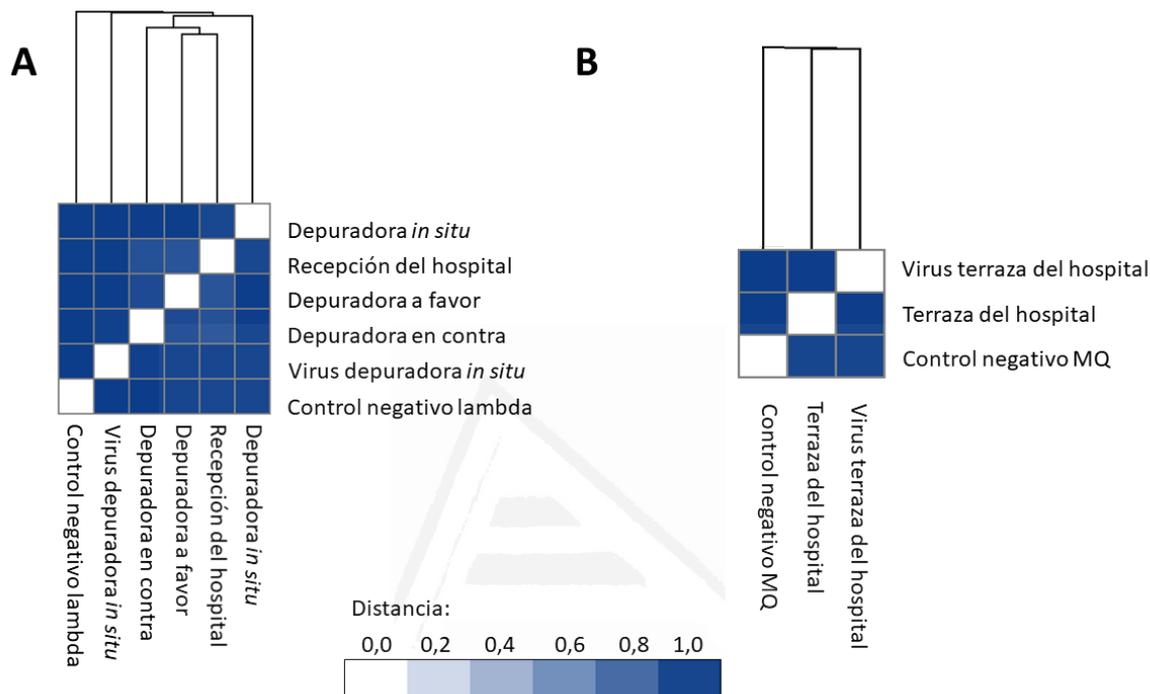


Figura 4.5. Resultados de MetaFast (Ulyantsev *et al.*, 2016) al comparar las muestras con sus respectivos controles. En el panel A, las muestras obtenidas mediante Rienke *et al.* (2016) que corresponden a las del aire de recepción del hospital, las obtenidas de la depuradora y el control negativo realizado con el fago lambda. En el panel B, se comparan las muestras de virus de la terraza del hospital, la terraza del hospital y el control negativo con agua mili-Q (MQ) realizados todos con MDA. De las muestras realizadas con MDA, la distancia mínima fue 0,99. Cuando se indique virus, se hace referencia a ADN obtenido de filtros de $0,02\mu\text{m}$. Según se va oscureciendo el color implica mayor distancia entre las muestras (ej. Blanco implica ser iguales, azul marino oscuro distancia máxima).

Las muestras más similares entre ellas (según MetaFast (Ulyantsev *et al.*, 2016)), fueron las de la recepción del hospital con la muestra de aire a favor de la depuradora (0,879; Figura 4.5) y la de la recepción del hospital con la muestra de aire en contra de la depuradora (0,898; Figura 4.5).

El segundo paso de limpieza consistió en la eliminación de lecturas de las muestras similares a la de los controles negativos, que se realizó comparándolas mediante BLASTn. Todas aquellas lecturas de las muestras con una identidad mayor o igual al 80% y una cobertura mayor o igual al 50% comparadas con los controles negativos fueron eliminadas para análisis posteriores dando lugar a un porcentaje de lecturas eliminados que varió entre 0,03% y el 27,29% en función de la muestra (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Lecturas obtenidas tras usar Trimmomatic (Bolger et al., 2014) y tras limpiar las muestras comparándolas con sus respectivos controles negativos

Muestra	Número de lecturas tras usar Trimmomatic					Número de lecturas limpias respecto a los controles					Lecturas eliminadas (%) ¹
	Paired R1	Paired R2	Unpaired R1	Unpaired R2	TOTAL	Paired R1	Paired R2	Unpaired R1	Unpaired R2	TOTAL	
Depuradora <i>in situ</i>	6400495	6400495	2009837	106597	14917424	4660283	4660283	1440763	85253	10846582	27,29
Virus Depuradora <i>in situ</i>	1740717	1740717	254627	29607	3765668	1740113	1740113	254570	29588	3764384	0,03
Depuradora en contra	1468421	1468421	184600	33373	3154815	1455277	1455277	183582	33222	3127358	0,87
Depuradora a favor	544513	544513	94928	7014	1190968	541741	541741	91841	6946	1182269	0,73
Recepción del hospital	8370695	8370695	4220431	176153	21137974	7821146	7821146	4155300	353379	20150971	4,67
Terraza del hospital	84137055	84137055	15821870	1413321	185509301	75982373	75982373	14993009	1317880	168275635	9,29
Virus terraza del hospital	1627558	1627558	339482	23780	3618378	1326969	1326969	442551	158527	3255016	10,04

¹El porcentaje de lecturas eliminadas se calculó restando a el número total de lecturas obtenidas por Trimmomatic el número de lecturas totales limpias respecto a los controles y se dividió por el número de lecturas obtenidas tras usar Trimmomatic.

4) Análisis de la comunidad microbiana presente en el aire

Las lecturas que no fueron eliminadas del análisis (distintas a los controles) se emplearon para realizar una anotación taxonómica aplicando Kaiju (Menzel *et al.*, 2016) contra la base de datos nr_euk, que contiene proteínas de arqueas, bacterias, virus, hongos y eucariotas microbianos. La mayoría de las lecturas no fueron clasificadas (63-98%) y entre las que sí fueron, se detectó la presencia de bacterias, hongos y en menor medida virus para todas las muestras analizadas.

Para el estudio de la abundancia relativa de los diferentes taxones encontrados en el aire (Figura 4.6) no se incluyeron las muestras amplificadas mediante MDA (terracea del hospital y virus de esta) ya que esta metodología introduce un sesgo que compromete la precisión del análisis cuantitativo (Yilmaz *et al.*, 2010).

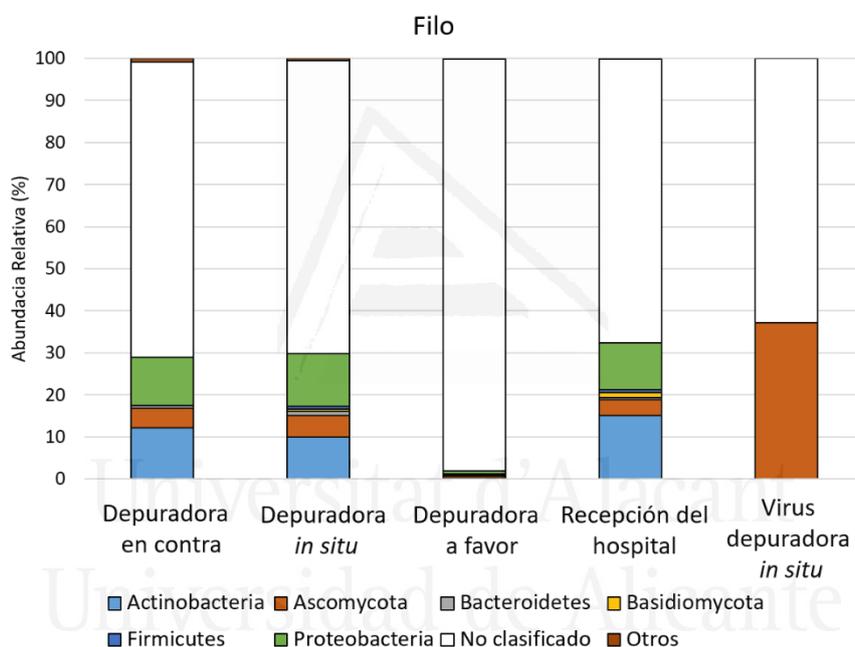


Figura 4.6. Filos encontrados en los datos no ensamblados al contrastarlos empleando Kaiju con la base de datos nr_euk. Sólo se representaron aquellos filos cuya abundancia relativa fue igual o superior al 1% en al menos una de las muestras. Predominan las lecturas no clasificadas en todas las muestras (blanco).

Los taxones dominantes encontrados empleando a Kaiju (Menzel *et al.*, 2016) en la depuradora l'Alacantí Nord son similares al de otros estudios sobre bioaerosoles en depuradoras. Tienen en común los filos de hongos principales (*Ascomycota* y *Basidiomycota*) y también dos de los tres filos bacterianos más abundantes en este estudio realizado en Pekín, siendo estos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* (Han *et al.*, 2019). En nuestro caso aparece también el filo *Actinobacteria* como uno de los más abundantes. En la recepción del hospital, los filos bacterianos dominantes encontrados (*Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes*) están también entre los dominantes encontrados en la entrada de un hospital de San Diego (EE. UU.) (King *et al.*, 2016) y en el aire que sale a través

de la ventilación al exterior en un hospital de la ciudad de Cantón (China) (Wu *et al.*, 2022), aunque las proporciones y el orden de abundancia varía en función de la localización de la muestra. Ante el alto número de lecturas que no pudieron ser clasificadas al compararse con la base de datos euk_nr (59-98% del total según la muestra; Tabla 4.4), procedimos a identificar una subselección de lecturas (que representaba entre el 1-2% del total de las lecturas no clasificadas) comparándola con la base de datos de la nt (NCBI) para tratar de identificar taxones no presentes en la euk_nr (Tabla 4.4). Sólo aquellas lecturas con una identidad mayor o igual al 95% a la nt de la NCBI y un e-value $\leq 10^{-5}$ fueron incorporadas al análisis.

Tabla 4.4. Análisis de las lecturas que no se pudieron asignar a ningún taxón mediante Kaiju.

Muestra	Lecturas totales	N de lecturas no asignadas con Kaiju	% de lecturas no asignadas con Kaiju	Lecturas no asignadas con Kaiju			
				% de lecturas extraídas de las no asignadas	N de lecturas extraídas de las no asignadas	N de lecturas asignadas con la nt	% de lecturas asignadas con la nt ¹
Depuradora en contra	3127358	2029356	64,89	1	20242	1481	7,32
Depuradora <i>in situ</i>	10846582	7356111	67,82	1	73027	15513	21,24
Depuradora a favor	1182269	1153559	97,57	2	22401	1105	4,93
Recepción del hospital	20150971	11829940	58,71	1	118318	26271	22,20
Virus depuradora <i>in situ</i>	3764384	2361414	62,73	1	23813	16068	67,47

¹ Porcentaje de aquellas lecturas no clasificadas con Kaiju que si fueron clasificadas con la nt.

La búsqueda en la base de datos de NCBI muestra que entre un ≈ 5 y un 67% de las lecturas no identificadas con la base de datos euk_nr, se asignaron al compararlas contra la nt (NCBI) a bacterias, hongos, plantas o artrópodos (en su mayoría insectos) y humanos (*Homo sapiens*), cuyas proporciones variaron en función de la muestra analizada (Tabla 4.4; Figura 4.7). Aparecieron, además, lecturas asignadas a arqueas que no aparecieron en el primer análisis. Encontramos secuencias asociadas a *Homo sapiens* en todas las muestras, teniendo una especial relevancia en la depuradora *in situ* y en la recepción del hospital; lo

cual es absolutamente esperable ya que hay células, restos celulares y de tejido humano en forma de aerosoles. La presencia de ADN humano se detectó también en otras muestras de aire tomadas en Nueva York y San Diego, tanto en el exterior como en el interior de un edificio, un hospital y una casa (Yooseph *et al.*, 2013).

Realizando una extrapolación con las lecturas clasificadas con Kaiju (Menzel *et al.*, 2016) y la base de datos nt de NCBI, finalmente el número de lecturas sin clasificar continuaría siendo alto a excepción de los virus de depuradora in situ (20% sin clasificar) aunque la mayoría de las lecturas se asignan a hongos en lugar de a virus. Del resto de muestras, todas tendrían más de un 45% de lecturas sin asignar, siendo la mayor la del aire de la depuradora a favor (79% sin asignar).

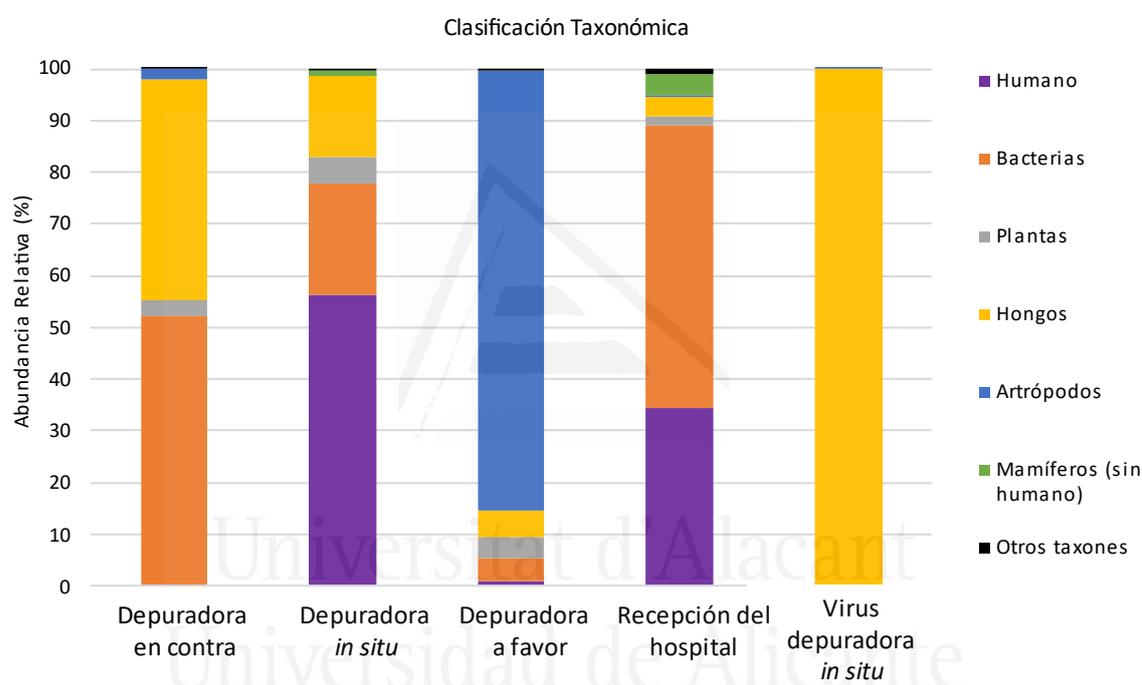


Figura 4.7. Clasificación taxonómica mediante la base de datos nr de la NCBI de una submuestra de aquellas lecturas que no pudieron ser clasificadas con la base de datos de Kaiju euk_nr (Menzel *et al.*, 2016). En la gráfica se muestran los grupos taxonómicos cuya abundancia relativa fue mayor o igual a un 1% en al menos una de las muestras. Humano recoge aquellas lecturas asociadas a *Homo sapiens*, mientras que el resto hacen referencia a los reinos Plantae (plantas), Fungi (Hongos), y dentro de Animalia dos de los grupos más representados, mamíferos y artrópodos.

Aunque escasa, se detectó la presencia de lecturas asignadas a virus en todas las muestras excepto en la fracción enriquecida de virus (filtrada por 0,2 μm) de la muestra depuradora *in situ*. El mayor porcentaje de lecturas asignadas a virus se dio en la muestra del aire de la depuradora *in situ* (0,02%), seguida por la del viento a favor (0,01%) siendo esta ligeramente superior a la encontrada en la recepción del hospital. Estos bajos números pueden deberse a la baja concentración estimada de virus (y por tanto de ADN vírico) que hay en el aire en el interior de los edificios ($\approx 10^5/\text{m}^3$) y en el exterior (2,6 veces más que en

el interior) (Prussin *et al.*, 2015) en relación a otros ambientes como el marino con $\approx 10^7$ VLP/mL.

5) Presencia y abundancia de GRA en muestras no ensambladas

La presencia de GRA en muestras de aire no ensambladas fue comprobada comparando las lecturas con 3 bases de datos de GRA: CARD (Jia *et al.*, 2017), RESFAMS (Gibson *et al.*, 2015) y ARG-ANNOT (Gupta *et al.*, 2014). Sólo se consideró el *best-hit* para cada lectura, siempre que éste tuviera un *bit-score* mayor o igual a 70 y unas identidades en nucleótidos mayor o igual al 50% o mayor o igual al 90% (Figura 4.6). El empleo de una identidad del 50% puede dar lugar a la introducción de falsos positivos en el análisis y si la identidad se aumenta al 90%, este criterio es más restrictivo y, por tanto, podemos descartar GRA que si lo son. En este análisis empleamos ambos criterios de manera complementaria para tener dos referencias de las muestras.

Empleando una identidad con las bases de datos de GRA mayor o igual al 50%, se detectaron GRA en todas las muestras analizadas a excepción de la de virus del aire obtenido de la terraza del hospital. Cuando incrementamos la identidad a mayor o igual al 90%, que es un valor mucho más conservador, no se detectaron GRA en la muestra de virus de la depuradora *in situ* ni en la muestra de la terraza del hospital.

Fue la muestra del aire tomada en la recepción del hospital la que mayor riqueza, es decir, número de GRA, diferentes presentaba (Tabla 4.5). Esta riqueza de GRA superior en el aire de la recepción del hospital también ha sido descrita respecto a entradas de comunidades urbanas a 0,5 km del hospital y a 10 km del mismo en un estudio realizado en la ciudad de Guangzhou en China (He *et al.*, 2020).

Tabla 4.5. Riqueza o número de GRA diferentes en cada una de las muestras de aire no ensambladas analizadas a diferentes identidades de nucleótidos ($\geq 50\%$ y $\geq 90\%$).

Muestras de aire	Número de GRA diferentes	Número de GRA diferentes
	bs70, id50%	bs70, id90%
Depuradora <i>in situ</i>	161	42
Virus depuradora <i>in situ</i>	4	0
Depuradora en contra	165	26
Depuradora a favor	8	4
Recepción del hospital	408	184
Terraza del hospital	5	0
Virus terraza del hospital	0	0

Los hits de GRA encontrados se agruparon en 21 clases de antibióticos a los que otorgan resistencia según la base de datos CARD (Jia *et al.*, 2017). Aquellos GRA que dan resistencia a diferentes antibióticos (multi-antibióticos) fueron los más frecuentes tanto para la identidad de GRA $\geq 50\%$ (en 6 de las 7 muestras analizadas) como la $\geq 90\%$ (en 4 de las 7 muestras analizadas). La segunda clase más frecuente (en 5 de las 7 muestras analizadas a identidad $\geq 50\%$ y 4 de 7 a identidad $\geq 90\%$) fue la que agrupa a los GRA que otorgan resistencia a los beta-lactámicos (Tabla 4.6). En concordancia con ser la muestra con mayor riqueza de GRA diferentes, la muestra de la recepción del hospital es la que presenta resistencia a más clases de antibióticos diferentes, seguida por la depuradora *in situ*.

Se ha sugerido la universalidad de GRA contra aminoglucósidos, multi-antibióticos y sulfonamidas en aerosoles (Yang *et al.*, 2022), sin embargo, los estudios citados para realizar esta afirmación están todos realizados en China. Por ejemplo, en las muestras del aire de depuradora de Alicante no encontramos GRA que otorguen resistencia a las sulfonamidas (Tabla 4.6). Teniendo en cuenta que los GRA presentes en el agua de la depuradora pueden pasar a la atmósfera a través de procesos como la agitación y la aireación (Han *et al.*, 2019) y que la abundancia y diversidad de GRA encontrados en aguas residuales de regiones como Europa y Asia son diferentes (Hendriksen *et al.*, 2019), se hace patente la necesidad del análisis de más muestras de aire de otras partes del mundo para encontrar qué categorías de GRA son universales o bien características.

Tabla 4.6. Presencia de GRA agrupados por clase de antibiótico al que otorgan resistencia en las muestras de aire analizadas sin ensamblar¹.

Identidad ≥ 50%	Depuradora en Contra	Depuradora <i>in situ</i>	Depuradora a Favor	Recepción del hospital	Virus depuradora <i>in situ</i>	Virus terraza del hospital	Terraza del hospital
Aminocumarinas							
Aminoglucósidos							
Ácidos grasos con actividad antibacteriana							
Beta-lactámicos							
Diaminopirimidinas							
Fenicoles							
Fosfomicinas							
Glucopéptidos							
MLS							
Multi-antibióticos							
Mupirocina							
Nitroimidazoles							
Nucleósidos							
Peptídicos							
Pleuromutilinas							
Quinolonas							
Rifamicinas							
Sulfonamidas							
Tetracenicinas							
Tetraciclinas							
Triclosán							

Identidad ≥ 90%	Depuradora en Contra	Depuradora <i>in situ</i>	Depuradora a Favor	Recepción del hospital	Virus depuradora <i>in situ</i>	Virus terraza del hospital	Terraza del hospital
Aminocumarinas							
Aminoglucósidos							
Beta-lactámicos							
Diaminopirimidinas							
Fenicoles							
Fosfomicinas							
Glucopéptidos							
MLS							
Multi-antibiótico							
Mupirocina							
Nitroimidazoles							
Nucleósidos							
Peptídicos							
Quinolonas							
Rifamicinas							
Sulfonamidas							
Tetraciclinas							
Triclosán							

¹Presencia (verde) o ausencia (blanco) de resistencia a diferentes clases de antibióticos. MLS hace referencia al conjunto de antibióticos Macrólidos, Lincosamidas y Estreptomicinas.

A pesar de que la MDA se ha empleado para amplificar con éxito incluso ADN de virus individuales (Martinez-Hernandez *et al.*, 2017; De La Cruz Peña *et al.*, 2018), esta metodología presenta un sesgo a la hora de amplificar, lo que compromete el posterior análisis cuantitativo (Yilmaz *et al.*, 2010), por lo que para comparar la abundancia de los GRA detectados, no incluiremos las muestras realizadas con MDA en este análisis (terracea del hospital y virus de la terraza del hospital).

Para determinar la abundancia de GRA en las muestras no ensambladas, se compararon las muestras no amplificadas con MDA con tres bases de datos de GRA (CARD (Jia *et al.*, 2017), RESFAMS (Gibson *et al.*, 2015) y ARG-ANNOT (Gupta *et al.*, 2014)) escogiendo el *best-hit* para cada uno de los casos, siempre que este tuviera un *bit-score* ≥ 70 , identidad $\geq 50\%$ y *e-value* $\leq 10^{-5}$. Con los datos obtenidos se calculó la abundancia relativa de los GRA agrupados por las clases de antibióticos a los que otorgan resistencia, observando una mayor frecuencia de GRA que otorgan resistencia frente a multi-antibióticos, seguidos de beta-lactámicos o tetraciclinas en función de la muestra (Figura 4.8).

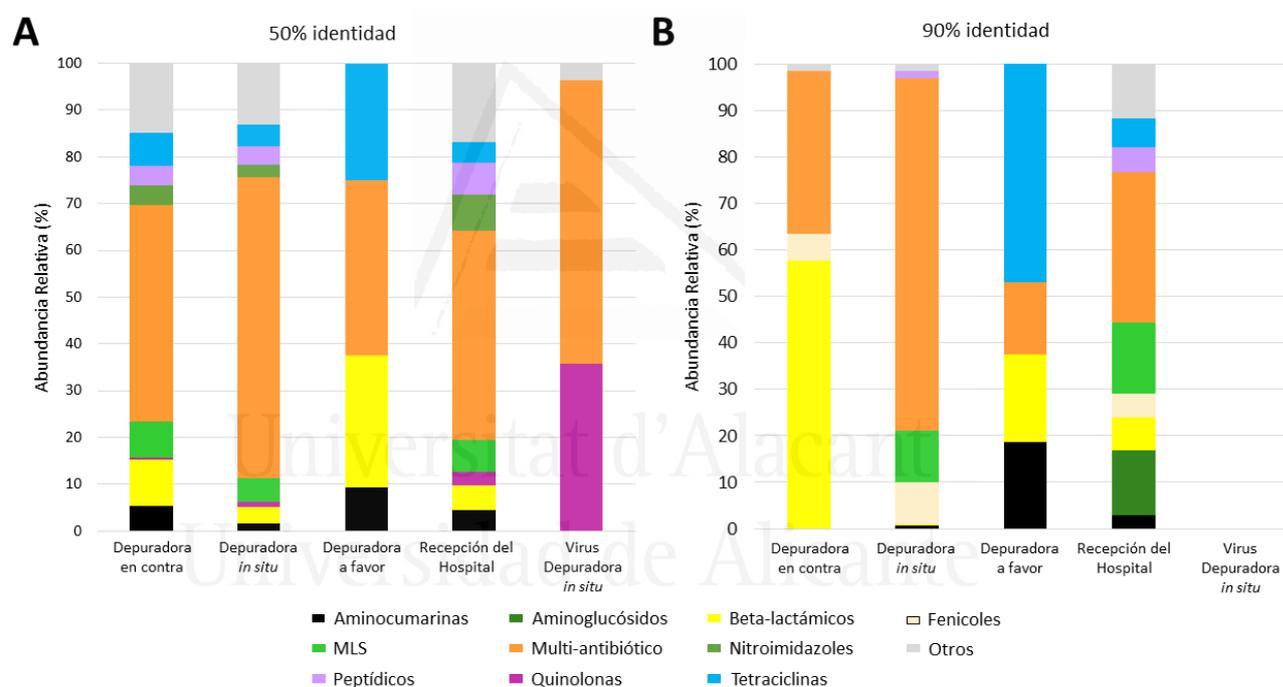


Figura 4.8. Abundancia relativa de los GRA agrupados por antibiótico al que dan resistencia. Sólo se representan aquellas clases de antibióticos cuya abundancia relativa de GRA era mayor o igual al 5%. Ambos análisis se hicieron comparando las lecturas de las muestras con las bases de datos de resistencia a antibiótico. En las gráficas se muestran los datos para una identidad $\geq 50\%$ (A) y $\geq 90\%$ (B). En los virus de la depuradora no se encontró ningún GRA con una identidad $\geq 90\%$, por lo que se dejó en blanco.

Además, con los mismos datos se realizó un Análisis de las Coordenadas Principales (ACoP) viendo como a una identidad $\geq 50\%$ se agrupan la muestra de la recepción del hospital y del aire de depuradora en contra, teniendo próxima a la de aire de la depuradora *in situ*. Si aumentamos la identidad a $\geq 90\%$ se observa como la del aire de la depuradora en contra y la depuradora *in situ* continúan próximas (Figura 4.9).

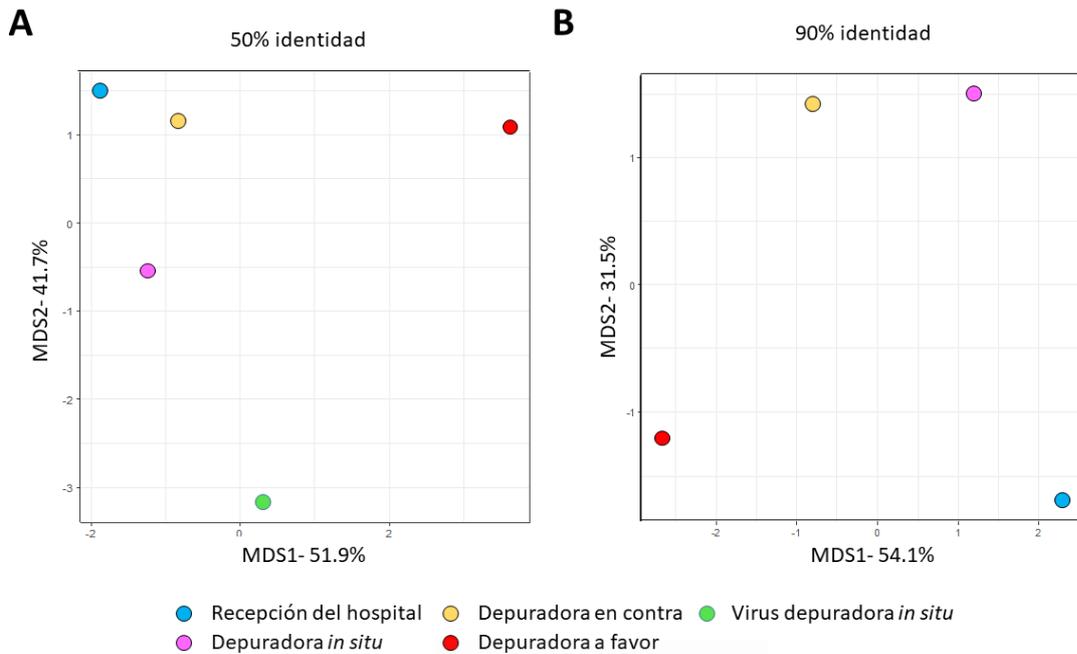


Figura 4.9. Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) para el estudio del resistoma en el aire de las diferentes muestras: Recepción del hospital (azul), Depuradora en contra (amarillo), Depuradora *in situ* (rosa), Depuradora a favor (rojo) y Virus de depuradora *in situ* (verde). Se realizó para identidad de GRA $\geq 50\%$ (A) y $\geq 90\%$ (B). Calculado empleando la distancia euclidiana y representado con ggplot2 (Para ambos se emplotó el software R).

Para el cálculo de la abundancia el número de GRA encontrados se dividió por las Megabases no ensambladas (Mb) de la muestra o por el número de genes ribosómicos 16S encontrados (Figura 4.6).

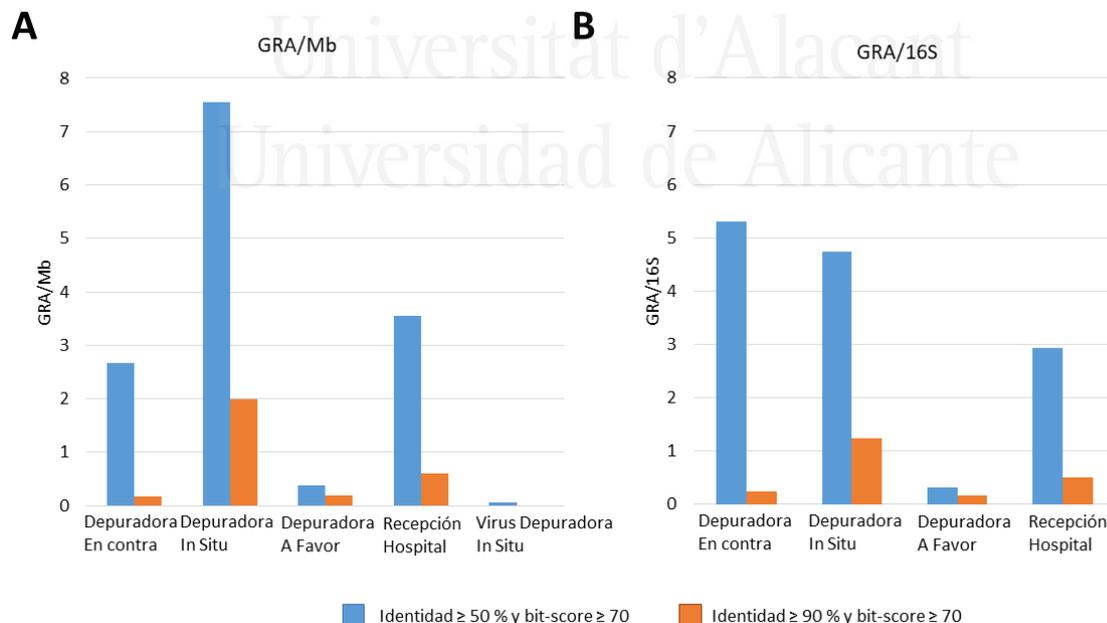


Figura 4.10. Abundancia de GRA en las muestras de aire no ensambladas. La abundancia de GRA fue calculada para dos identidades diferentes, $\geq 50\%$ en azul y $\geq 90\%$ en naranja. Para poder comparar los datos, estos se normalizaron dividiendo el número de GRA entre los Mb de la muestra (A) o el número de genes ribosómicos 16S encontrados en la misma (B).

La normalización por las Megabases no ensambladas y por metro cúbico de aire filtrado nos indica que hay más abundancia de GRA en la depuradora *in situ* (7,6 GRA/Mb ó 118 GRA/m³ de aire muestreado) seguida por la recepción del hospital (3,5 GRA/Mb ó 87 GRA/m³ de aire muestreado) para los dos criterios empleados para la detección de GRA, uno más laxo ($\geq 50\%$ de identidad) y otro más restrictivo ($\geq 90\%$ de identidad). Sin embargo, al normalizar por el gen ribosómico 16S observamos cómo encontramos más abundancia de GRA en la depuradora en contra de viento únicamente a identidad $\geq 50\%$ (Figura 4.6, panel A y B).

La ausencia de protocolos estándar para el muestreo de aire y la imposibilidad de aplicar un tipo de metodología para captar y analizar todos los bioaerosoles hace difícil la comparación entre muestras de aire tomadas con diferentes metodologías (Grinshpun *et al.*, 2015). Entre los factores que dificultan esta comparación están los diferentes modelos de muestreadores, los tiempos y flujo de recolección de aire, medios en los que se recogen los bioaerosoles y los análisis, por lo que hay diversos diseños experimentales posibles.

Nuestros datos muestran como el aire de la depuradora *in situ* tiene mayor abundancia de GRA comparado con el aire de la recepción del hospital (Figura 4.10). Este dato concuerda con los datos obtenidos en el muestreo de 6 ambientes en Tianjin (China), pese a que se hizo con qPCR para 19 GRA, en el que el promedio de los valores obtenidos para la depuradora ($8,6 \times 10^4$ copias GRA/m³) superan a los de una sala de transfusiones de hospital ($7,2 \times 10^4$ copias GRA/m³). En la literatura analizada, no hemos encontrado otro estudio que compare los GRA del aire obtenidos con un mismo protocolo de una depuradora y un hospital. Sin embargo, en los estudios metagenómicos realizados comparando el aire de hospital (tejado e interior) con el de ambientes urbanos, pese a que tienen diseños experimentales diferentes, se observa que la abundancia de GRA es superior en el hospital que en la ciudad o ambientes suburbanos (He *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2022) como ocurre si comparamos los valores de la abundancia del aire en contra de la depuradora y del hospital normalizados por Mb no ensambladas (Figura 4.10. panel A).

Entre los GRA más abundantes de los datos no ensamblados encontramos *abcA* (resistencia frente a multi-antibióticos) en el aire de la depuradora en contra y en los virus del aire de la depuradora *in situ* a identidad $\geq 50\%$. En el aire de la depuradora *in situ* el más abundante es *acrB* que da resistencia a multi-antibióticos (identidades ≥ 50 y $\geq 90\%$). Para ambas identidades de GRA estudiadas, en aire de la depuradora a favor, el GRA más abundante es *tet44* que otorga resistencia a las tetraciclinas. En el resto de las muestras el GRA dominante cambia en función del porcentaje de identidad proteica empleado. En la recepción del hospital el GRA más frecuentes es *ugd* que otorga resistencia frente a los antibióticos peptídicos al 50% y *erm36* que da resistencia frente a MLS al 90%. En el caso del aire de la depuradora en contra al 90% encontramos TEM-83 (resistencia frente a beta-lactámicos).

En la depuradora *in situ*, tanto para la fracción bacteriana ($>0,2 \mu\text{m}$) como para la filtrada por $0,02 \mu\text{m}$ (que corresponde a la llamada vírica) encontramos en los datos no

ensamblados que ambas tienen en común los genes *arr-1* y *abcA* que otorgan resistencia a rifamicina y a multi-antibióticos respectivamente.

También encontramos GRA clasificados como de alto riesgo para la salud humana ya que tienen una alta movilidad entre un amplio abanico de huéspedes (Zhang *et al.*, 2021). Entre estos encontramos que en el aire del lobby del hospital hay *vanY*, *tetM* y *blaZ* (a identidad $\geq 50\%$ y los dos últimos a identidad $\geq 90\%$) que otorgan resistencia a los glucopéptidos, tetraciclinas y beta-lactámicos. También encontramos *TEM-1* (resistencia a beta-lactámicos) en la muestra de aire de la depuradora en contra y *vanY* ($\geq 50\%$ identidad) en el aire de la depuradora *in situ*. El gen de resistencia frente a glucopéptidos *vanY* está también presente en las aguas de Alicante (incluidas depuradoras y hospital; Capítulo 3).

6) Presencia y abundancia de GRA en muestras ensambladas

Para la caracterización de aquellos microorganismos presentes en el aire que tienen al menos un GRA se procedió a ensamblar las lecturas empleando SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) y de los *contigs* se obtuvieron las ORF empleando el programa informático Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010). Por consistencia con los anteriores análisis presentados en esta tesis, los *contigs* de menos de 500 pb fueron eliminados del posterior análisis (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Resultado del ensamblaje realizado mediante SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) para las muestras de aire.

Muestra	Resultado de SPAdes		Contigs con ≥ 500 pb		
	N contigs	Nucleótidos	N contigs	Nucleótidos	N proteínas
Depuradora <i>in situ</i>	20442	7739368	2712	2061515	4042
Virus depuradora <i>in situ</i>	553	682270	255	581149	654
Depuradora en contra	19787	8165624	3492	2849982	5263
Depuradora a favor	3564	1156560	152	110786	150
Recepción del hospital	296110	120485474	46928	36466179	69192
Terraza del hospital	3654	2154155	985	1463134	1701
Virus terraza del hospital	178	220452	77	187814	188

Entre 150 y 69192 proteínas por muestra (Tabla 4.7) fueron comparadas con las bases de datos CARD (Jia *et al.*, 2017), ARG_ANNOT (Gupta *et al.*, 2014) y RESFAMS (Gibson *et al.*, 2015) mediante blastp. Sólo aquellos *best-hit* con un *bit-score* ≥ 70 , un *e-value* $\leq 10^{-5}$, e identidades $\geq 50\%$ ó $\geq 90\%$ fueron considerados como GRA. Los GRA fueron a su vez agrupados en función del antibiótico al que otorgaban resistencia (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Clases de antibióticos detectadas contra las que existe resistencia para cada una de las muestras ensambladas.

Identidad \geq 50%	Depuradora en Contra	Depuradora in Situ	Depuradora a Favor	Recepción del Hospital	Virus Depuradora in Situ	Virus Terraza del Hospital	Terraza del Hospital
Aminocumarinas							
Aminoglucósidos							
Ácidos grasos con actividad antibacteriana							
Beta-lactámicos							
Diaminopirimidinas							
Elfamicinas							
Fenicoles							
Fosfomicinas							
Glucopéptidos							
MLS							
Multi-antibióticos							
Nitroimidazoles							
Peptídicos							
Pleuromutilinas							
Quinolonas							
Rifamicinas							
Sulfonamidas							
Tetraciclinas							
Triclosán							

Identidad \geq 90%	Depuradora en Contra	Depuradora in Situ	Depuradora a Favor	Recepción del Hospital	Virus Depuradora in Situ	Virus Terraza del Hospital	Terraza del Hospital
Aminocumarinas							
Aminoglucósidos							
Beta-lactámicos							
Elfamicinas							
Fenicoles							
Fosfomicinas							
Glucopéptidos							
MLS							
Multi-antibióticos							
Nitroimidazoles							
Peptídicos							
Pleuromutilinas							
Quinolonas							
Rifamicinas							
Sulfonamidas							
Tetraciclinas							
Triclosán							

En las muestras ensambladas se encontraron 19 clases de antibióticos contra los que se detectó resistencia (\geq 50% identidad proteica), 3 menos que en la parte no ensamblada

(Tabla 4.6). Este dato es esperable ya que al ensamblar las lecturas para dar lugar a *contigs* siempre hay un porcentaje de éstas que no se ensamblan para dar lugar a fragmentos genómicos más largos, por lo que la información que puedan dar esas lecturas “se pierde” en la parte ensamblada (Capítulo 3, Figura 3.2). En este caso no encontramos GRA en los *contigs* de la muestra de aire de depuradora a favor, ni en las dos muestras de la terraza del hospital. Como ocurre en el análisis de la parte no ensamblada, encontramos mayor diversidad de antibióticos en la recepción del hospital que en el resto de las muestras (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Número de GRA diferentes en cada una de las muestras de aire analizadas a diferentes identidades proteicas para los datos ensamblados.

Muestras de aire	Número de GRA diferentes	
	bs70, id50%	bs70, id90%
Depuradora <i>in situ</i>	18	4
Virus depuradora <i>in situ</i>	1	0
Depuradora en contra	27	1
Depuradora a favor	0	0
Recepción del hospital	106	15
Terraza del hospital	3	0
Virus terraza del hospital	0	0

En la Figura 4.11 podemos observar las abundancias relativas de los GRA para las muestras no amplificadas con MDA. Se observa que los GRA que dan resistencia a multi-antibióticos son los más abundantes en la depuradora (*in situ* y en contra) y en el hospital a una identidad de GRA $\geq 50\%$. En el caso de los virus de depuradora en la parte ensamblada sólo encontramos resistencia a la quinolona (Figura 4.11).

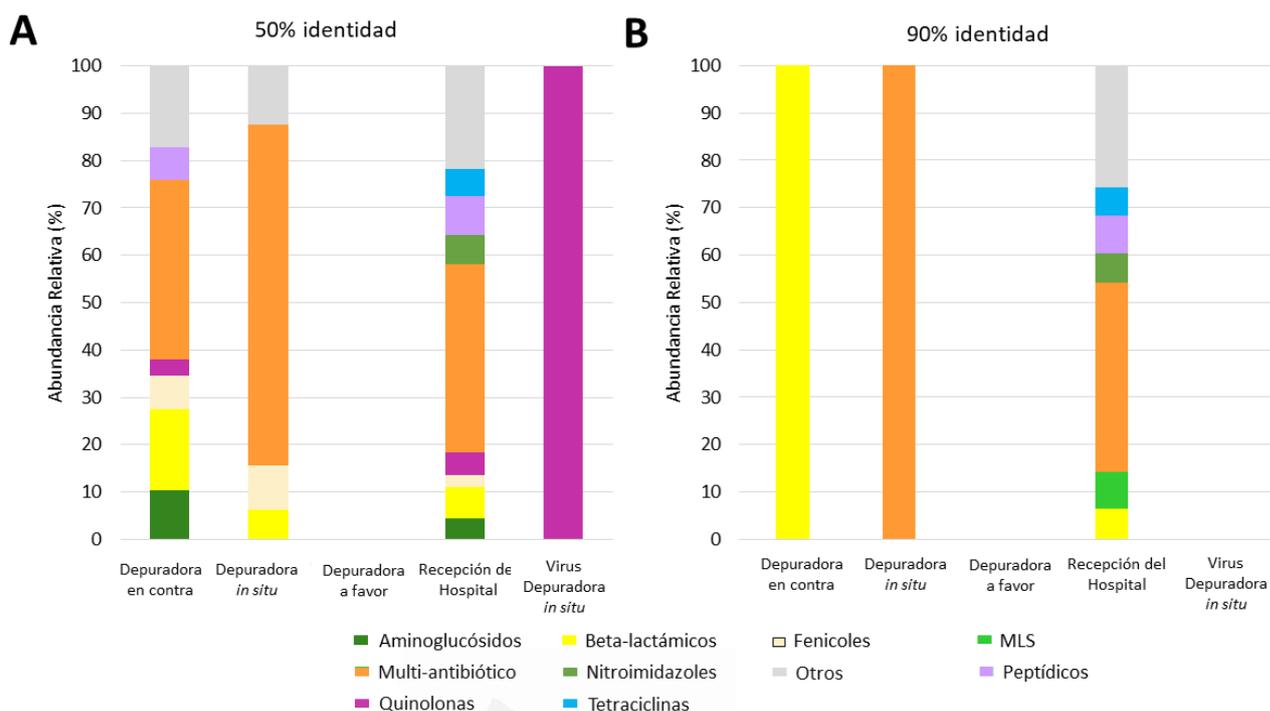


Figura 4.11. Abundancia relativa de los GRA agrupados por antibiótico al que dan resistencia. Sólo se representan aquellas clases de antibióticos cuya abundancia relativa de GRA es mayor o igual al 5%. Ambos análisis se hicieron comparando las proteínas de las muestras con las bases de datos de resistencia a antibiótico. En las gráficas se muestran los datos para una identidad mayor o igual a 50% (A) o 90% (B). Los espacios en blanco implican que no se detectaron GRA.

Las muestras de aire se agruparon en función de los antibióticos a los que presentaron resistencia. A una identidad proteica $\geq 50\%$ en la parte ensamblada, vemos como las dos muestras de la depuradora (en contra e *in situ*) en las que se detectaron GRA se agrupan. A un 90% o más identidad no observamos el agrupamiento de ninguna de las tres muestras en las que se encuentran GRA (Figura 4.12).

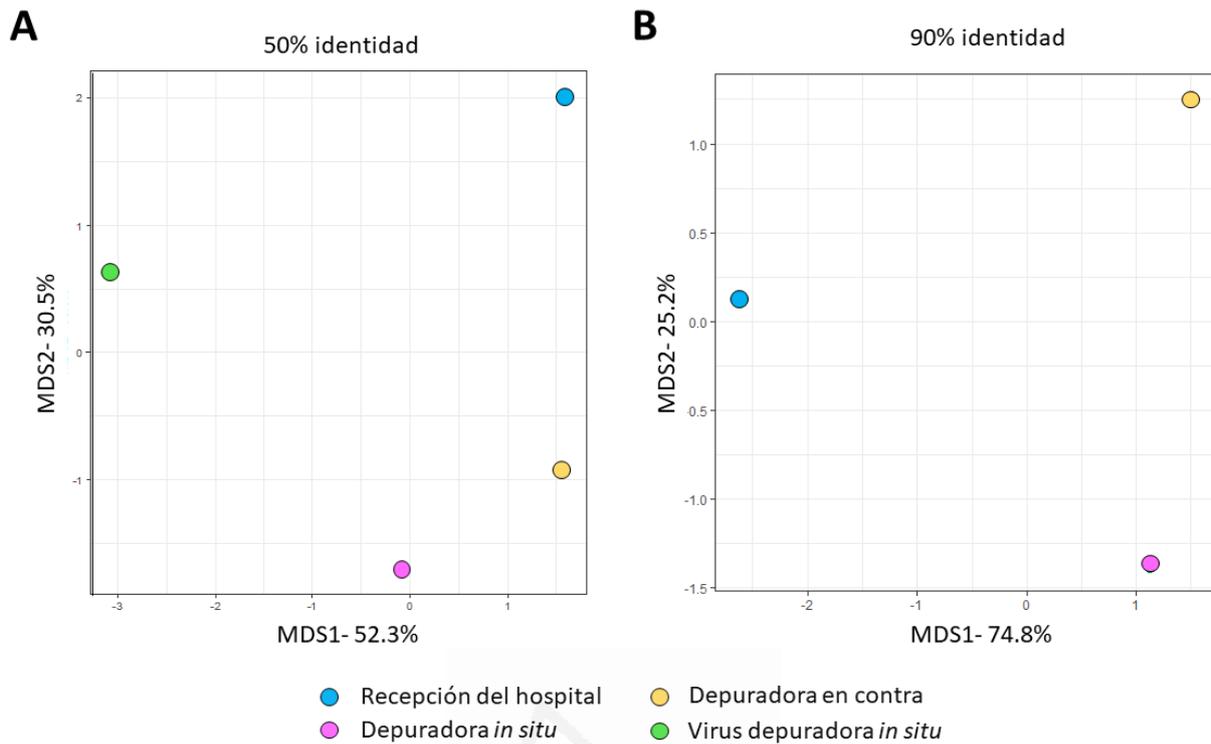


Figura 4.12. Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) para el estudio del resistoma ensamblado en el aire de las diferentes muestras: Recepción del hospital (azul), depuradora en contra (amarillo), depuradora *in situ* (rosa) y virus de depuradora *in situ* (verde.). Se realizó para identidad de GRA $\geq 50\%$ (A) y $\geq 90\%$ (B). Calculado empleando la distancia euclidiana y representado con ggplot2 (Para ambos se empleó el software R).

La abundancia de GRA detectados en los datos ensamblados muestra, igual que en los datos no ensamblados, más abundancia de GRA si comparamos el aire de la depuradora *in situ* con el de la recepción del hospital (Figura 4.13).

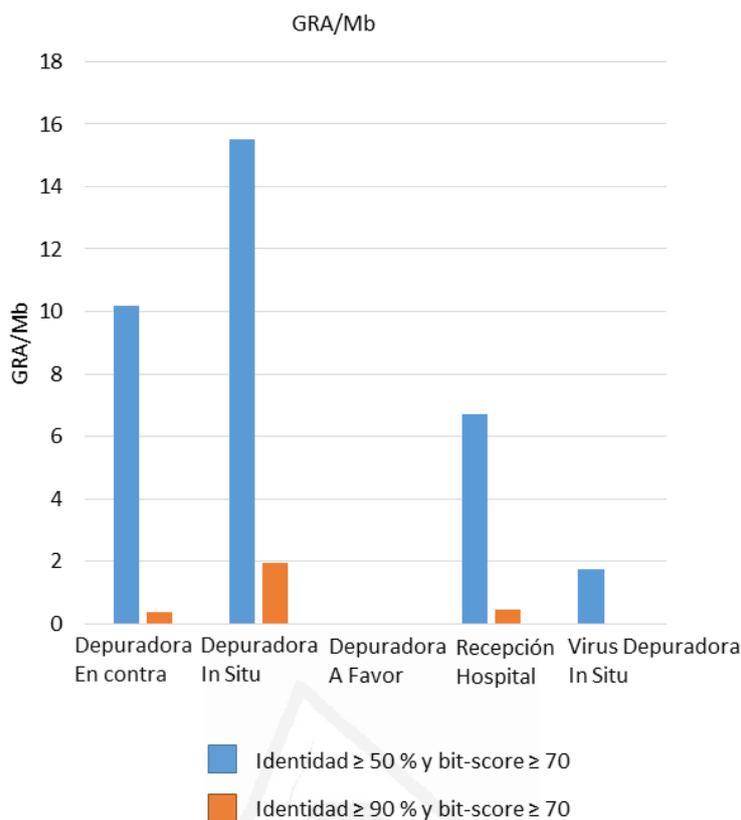


Figura 4.13. Abundancia de GRA en las muestras de aire ensambladas. La abundancia de GRA fue calculada para dos identidades proteicas diferentes, $\geq 50\%$ en azul y $\geq 90\%$ en naranja. Para poder comparar los datos, estos se normalizaron dividiendo el número de GRA entre los de Mb ensamblados.

7) Identificación taxonómica de *contigs* portadores de GRA presentes en el aire

Una vez identificadas aquellas proteínas que otorgaban resistencia a antibióticos, se analizaron taxonómicamente los *contigs* donde éstas se incluían. Para identificar qué microorganismos son los portadores de éstos GRA se compararon estos *contigs* con la base de datos euk_nt empleando Kaiju (Menzel *et al.*, 2016). Como sucedió en el análisis taxonómico en la parte no ensamblada, un gran porcentaje de las muestras no pudo ser identificado ($\sim 50\%$; Figuras 4.14 y 4.15).

A nivel de especies resistentes a antibióticos, encontramos en el aire de la depuradora en contra dos especies de *Sinorhizobium* (*S. meliloti* y *S. medicae*) que habitualmente son simbiontes de leguminosas (Biondi *et al.*, 2003) que podrían provenir de los árboles de cultivo que hay al sur de la depuradora. En la muestra tomada en la depuradora in situ vemos que la especie resistente más frecuente es *Acinetobacter junii* (26,66%), seguida por *Mycobacterium sp.* (6,66%) ambas especies son bacterias resistentes a antibióticos frecuentes en las aguas de Alicante (Capítulo 3, Figura 3.6) y *Flexivirga endophytica* una bacteria asociada a vegetales (Figura 4.14). En el aire de la depuradora in situ el GRA más frecuente a identidad proteica $\geq 50\%$ fue *adeJ* (multi-antibióticos), que también fue el más

frecuente a una identidad $\geq 90\%$, compartiendo la posición con otras bombas de flujo que otorgan resistencia frente a multi-antibióticos como *OprM*, *acrB* y el gen *cfr 23S* que codifica una metilasa de la subunidad ribosómica 23S, que al metilarla, le otorga resistencia frente a diferentes antibióticos. En el aire de depuradora en contra encontramos que los GRA más abundantes son *sav1866* (multi-antibióticos) y *macB* (MLS), ambas bombas de flujo a identidad $\geq 50\%$. Al 90% encontramos el gen TEM-166 de resistencia frente a beta-lactámicos.

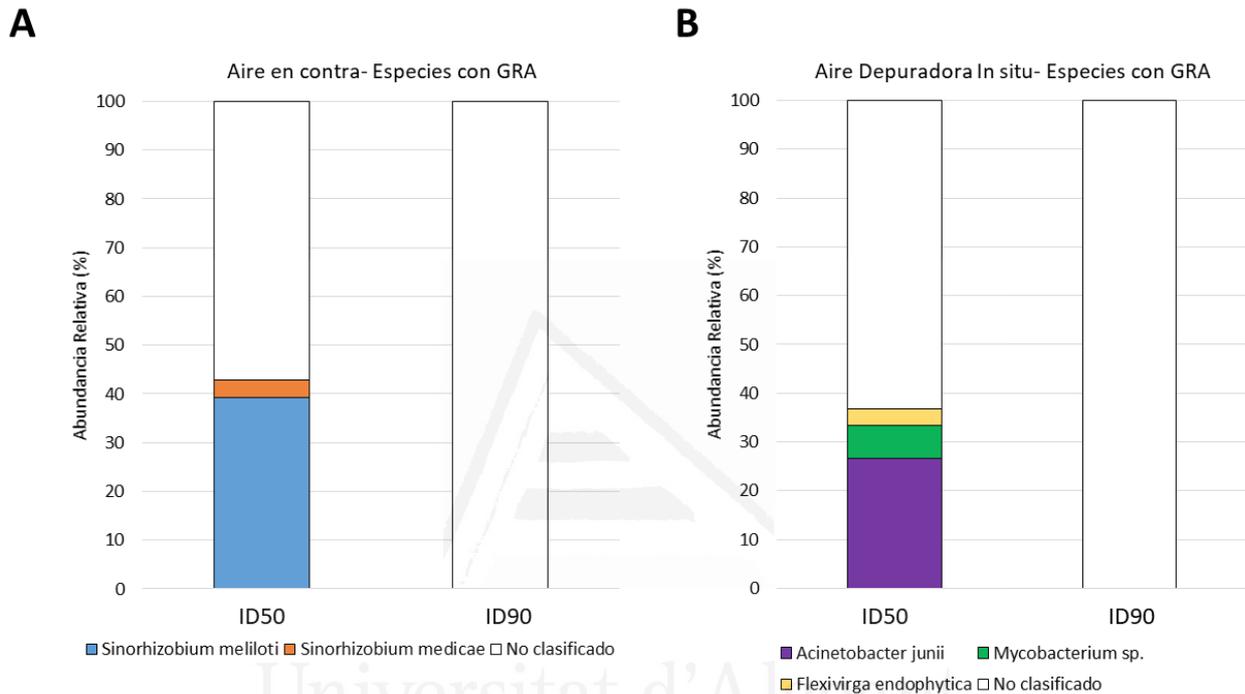


Figura 4.14. Abundancia relativa (%) de las especies detectadas con al menos un GRA en las muestras de aire en contra de la depuradora (A) e in situ (B). Las abundancias relativas están expresadas para una identidad de GRA $\geq 50\%$ (ID50) y una identidad $\geq 90\%$ (ID90). La clasificación taxonómica de los contigs se hizo empleando Kaiju. Para los contigs cuyos GRA tuvieron una identidad $\geq 90\%$ respecto a las bases de datos de GRA no se pudo clasificar ningún contig a nivel de especie.

En la recepción del hospital encontramos 62 especies resistentes a antibióticos. Entre estas, destacar que la más frecuente es el patógeno oportunista *Paracoccus yeei* (Figura 4.15). En su mayoría en el caso de las bacterias, su origen suele ser el suelo (*Paracoccus aeridis*, *Micrococcus terreus*) aunque también encontramos bacterias generalmente transportadas por el ser humano como *Staphylococcus hominis*, *Cutibacterium acnes* y patógenos como *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella enterica*. Entre los GRA más frecuentes en la parte ensamblada de la muestra de aire de recepción del hospital encontramos *mtrA* y *triC* (bombas de flujo que dan resistencia a multi-antibióticos) y *ugd* (da resistencia frente a antibióticos peptídicos) a una identidad de GRA $\geq 50\%$, si aumentamos la identidad $\geq 90\%$, *tetA* (resistencia a tetraciclinas) es el GRA más abundante.

Además de encontrar la presencia de GRA en bacterias también la encontramos en hongos en el aire de la entrada del hospital. En la literatura encontramos que algunos hongos del

suelo pueden transportar plásmidos con GRA, favoreciendo la transmisión de éstos entre las comunidades microbianas presentes en la micosfera (Nazir *et al.*, 2017). Entre las especies de hongos con GRA encontradas están patógenos de plantas como *Parastagonospora nodorum*, *Daldinia* sp. EC12 o *Eutypa lata*.

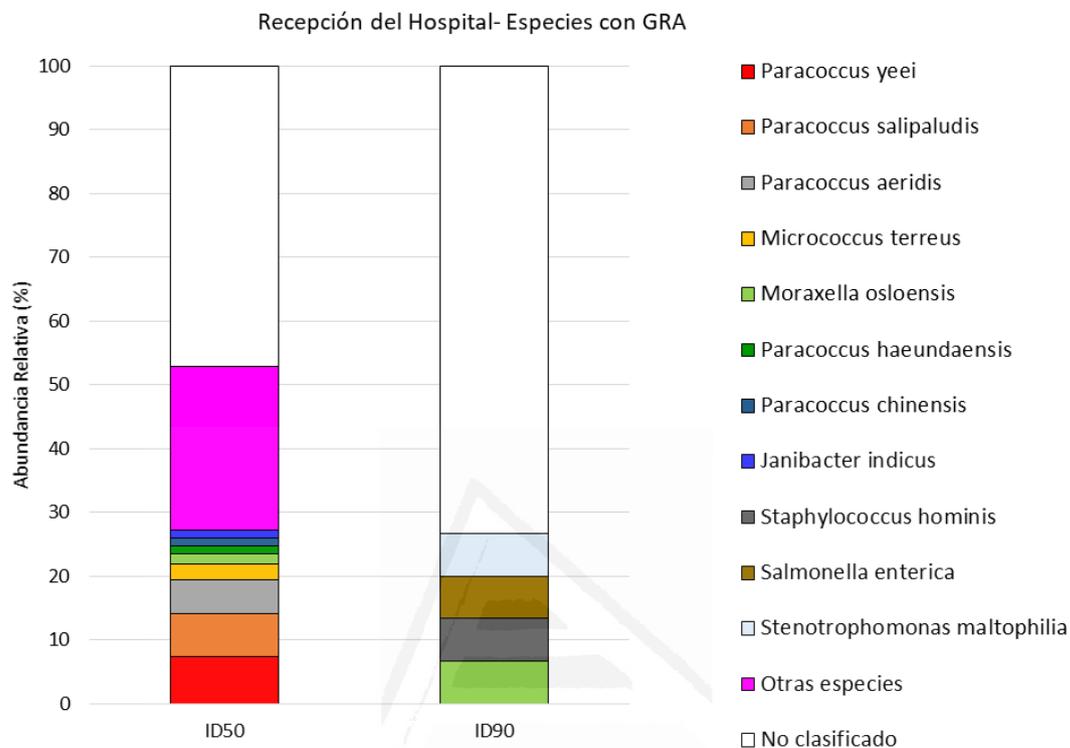


Figura 4.15. Abundancia relativa (%) de las especies detectadas con al menos un GRA en las muestras de aire de la recepción del Hospital General de Alicante. Las abundancias relativas están expresadas para una identidad de GRA $\geq 50\%$ (ID50) y una identidad $\geq 90\%$ (ID90). La clasificación taxonómica de los contigs se hizo empleando Kaiju.

La presencia de virus en el aire es patente y ha sido demostrada (Prussin *et al.*, 2015), además, se sabe que a pesar de que es poco común, los virus pueden también transportar GRA (Enault *et al.*, 2017; Capítulo 2, Figura 5). Existen diversos estudios referidos a la presencia de virus en el aire debido a su importancia en la transmisión de enfermedades (Kim *et al.*, 2018; Greenhalgh *et al.*, 2021) pero hasta la fecha, no hemos encontrado ninguno que haya explorado la presencia de GRA en *contigs* víricos obtenidos del aire. De las dos muestras de virus analizadas, virus de la terraza del hospital y virus de la depuradora *in situ* vemos que en la partes no ensamblada y ensamblada únicamente detectamos GRA en la muestra de virus de la depuradora a identidades mayores que 50% e inferiores al 90%. Empleando Kaiju (Menzel *et al.*, 2016) sobre los *contigs* con al menos un GRA no se detectó ningún fragmento vírico en ninguna de las muestras con GRA, sin embargo, usando VirSorter2 (Guo *et al.*, 2021) encontramos 1 *contigs* vírico en la recepción del hospital con el gen *mtrA*, una bomba de flujo que da resistencia frente a multi-antibióticos (Tabla 4.10). Este supone el único GRA en un *contig* vírico de los 54601 *contigs* totales analizados (Tabla

4.7). Por tanto, podemos confirmar que como sucede en otros ambientes, la presencia de GRA en virus del aire es escasa.

Tabla 4.10. *Contigs víricos con presencia de GRA detectados en el aire.*

<i>Contig</i>	Máxima puntuación (VirSorter2)	Tipo de Virus	% proteínas víricas	% proteínas celulares	GRA
lobbyHosp_817_length_2066	0,907	dsDNA	100	0	<i>mtrA</i>

Respecto a la presencia de multirresistencias (dos o más GRA que otorgan resistencia a dos o más clases de antibióticos) únicamente encontramos un *contig* multirresistente en el aire de la depuradora en contra, del que desconocemos la afiliación taxonómica. Este *contig* tiene los genes *amrB* de resistencia a los aminoglucósidos y *mexA* que otorga resistencia frente a varios antibióticos.

8) Transporte aéreo de GRA

El transporte de bacterias por el viento ha sido demostrado incluso a grandes distancias (Hervàs *et al.*, 2009) . Por tanto, los GRA que estén codificados en el ADN de aquellas bacterias que estén en el viento serán también transportados. En el caso del transporte de GRA desde puntos calientes como las depuradoras, en un estudio realizado con qPCR en una depuradora de Carolina del Sur (EE.UU.) se observó que el 68% de los GRA encontrados en la muestra tomada a favor de viento se correspondían con los GRA encontrados en los lodos de decantación de la depuradora (Gaviria-Figueroa *et al.*, 2019).

En nuestro caso, vemos como en la parte no ensamblada el 71,45% de las especies detectadas con Kaiju en el aire de la depuradora en contra son comunes con la depuradora *in situ* y un 84,96% de las especies encontradas en el aire de la depuradora a favor son comunes con la depuradora *in situ*, por lo que el aire a favor de la depuradora tiene una alta influencia a nivel de la comunidad microbiana de la depuradora *in situ*. Respecto a los GRA detectados, a una identidad de nucleótidos del 50% encontramos tres bombas de flujo (*acrB*, *mdtB*, y *abcA*) y el gen *tetA(48)*, que codifica una encima que degrada las tetraciclinas, en los tres puntos de muestreo de la depuradora. Estos datos suponen que un 45,5% de los GRA encontrados en el viento de la depuradora a favor están también en las otras dos muestras de la depuradora, por lo que son GRA que parecen estar en el aire que circula por la depuradora, sin que necesariamente ésta sea el origen de estos GRA en el aire. También encontramos sólo un gen (*PBP1a* de resistencia a beta-lactámicos) común entre el aire de la depuradora *in situ* y a favor. Además, hay un 36% de los GRA del aire de la depuradora a favor que no aparecen en las otras muestras de aire de la depuradora analizados, por lo que desconocemos su origen (Figura 4.16 panel A).

Siendo más estrictos (identidad de nucleótidos $\geq 90\%$) encontramos la presencia del gen *mdtB* únicamente en el aire de la depuradora *in situ* y a favor. Esto implica que el 25% de los GRA del aire de depuradora a favor son transportados desde la depuradora *in situ* (no están en el aire de la depuradora en contra) y el restante 75% son GRA no detectados en las otras muestras de la depuradora (Figura 4.16 panel B), por lo que en este caso sí detectamos el transporte de GRA desde la depuradora *in situ* y a favor de aire.

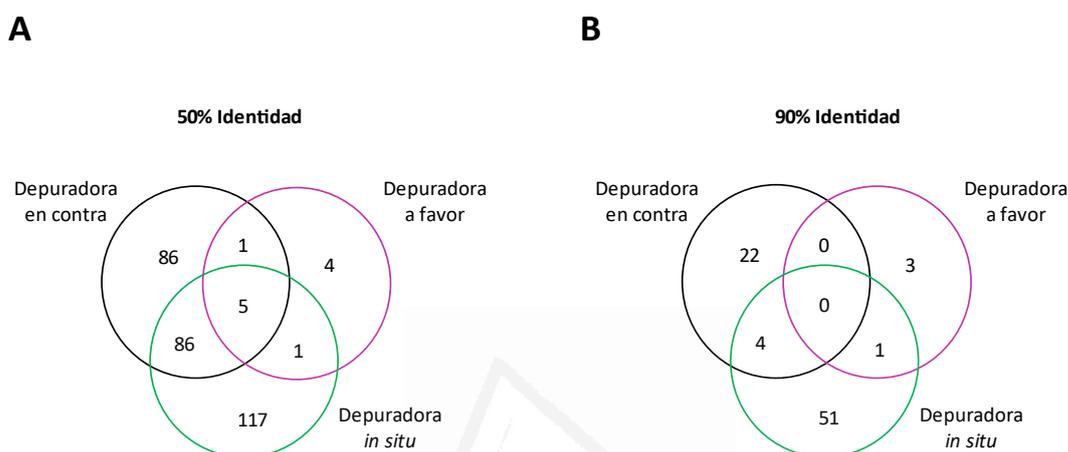


Figura 4.16. Diagrama de Venn para los GRA diferentes encontrados en las tres muestras de aire de la depuradora. Realizado con los datos no ensamblados.

La presencia y transporte de GRA por parte del aire puede ser una de las explicaciones de la presencia de GRA en el sistema respiratorio humano, concretamente en las fosas nasales (Capítulo 2 de esta tesis). En este estudio hemos detectado GRA tanto en el exterior como en el interior (recepción del hospital), este dato cobra especial importancia ya que el ser humano pasa la mayor parte del tiempo en el interior (Heseltine and Rosen, 2009), en el que se estima que hay una mayor concentración de GRA respecto al exterior con estudios realizados mediante HT-qPCR (Zhao *et al.*, 2021), dato apoyado por nuestros datos metagenómicos donde encontramos más GRA/Mb en la recepción del hospital que en aire de la depuradora en contra.

Todo esto puede suponer una mayor probabilidad de que se depositen GRA en la piel y en las fosas nasales donde acceden al sistema respiratorio mediante la inhalación, pudiendo provocar problemas de salud (Gwenzi *et al.*, 2022) por lo que cobra importancia la correcta ventilación de los espacios cerrados para prevenir la acumulación de elementos dañinos para la salud.

Bibliografía

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., et al. (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* **19**: 455.
- Bauer, H., Giebl, H., Hitzemberger, R., Kasper-Giebl, A., Reischl, G., Zibuschka, F., and Puxbaum, H. (2003) Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. *J Geophys Res* **108**: 4658.
- Behzad, H., Gojobori, T., and Mineta, K. (2015) Challenges and Opportunities of Airborne Metagenomics. *Genome Biol Evol* **7**: 1216–1226.
- Biondi, E.G., Pilli, E., Giuntini, E., Roumiantseva, M.L., Andronov, E.E., Onichtchouk, O.P., et al. (2003) Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 207–213.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114–2120.
- Cao, C., Jiang, W., Wang, B., Fang, J., Lang, J., Tian, G., et al. (2014) Inhalable microorganisms in Beijing's PM_{2.5} and PM₁₀ pollutants during a severe smog event. *Environ Sci Technol* **48**: 1499–1507.
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B., and Petit, M.-A. (2017) Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J* **11**: 237–247.
- Gao, M., Qiu, T., Sun, Y., and Wang, X. (2018) The abundance and diversity of antibiotic resistance genes in the atmospheric environment of composting plants. *Environ Int* **116**: 229–238.
- Gaviria-Figueroa, A., Preisner, E.C., Hoque, S., Feigley, C.E., and Norman, R.S. (2019) Emission and dispersal of antibiotic resistance genes through bioaerosols generated during the treatment of municipal sewage. *Sci Total Environ* **686**: 402–412.
- Georgakopoulos, D.G., Després, V., Fröhlich-Nowoisky, J., Psenner, R., Ariya, P.A., Pósfaj, M., et al. (2009) Microbiology and atmospheric processes: biological, physical and chemical characterization of aerosol particles. *bg.copernicus.org* **6**: 721–737.
- Gibson, M.K., Forsberg, K.J., and Dantas, G. (2015) Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J* **9**: 207–16.
- Glassing, A., Dowd, S.E., Galandiuk, S., Davis, B., and Chiodini, R.J. (2016) Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathog* **8**: 1–12.
- Greenhalgh, T., Jimenez, J.L., Prather, K.A., Tufekci, Z., Fisman, D., and Schooley, R. (2021) Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. *Lancet* **397**: 1603–1605.

- Grinshpun, S.A., Buttner, M.P., Mainelis, G., and Willeke, K. (2015) Sampling for Airborne Microorganisms. In *Manual of Environmental Microbiology*. pp. 3.2.2-1-3.2.2-17.
- Guo, J., Bolduc, B., Zayed, A.A., Varsani, A., Dominguez-Huerta, G., Delmont, T.O., et al. (2021) VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome* **9**:
- Gupta, S.K., Padmanabhan, B.R., Diene, S.M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., and Rolain, J.-M. (2014) ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 212–220.
- Gwenzi, W., Shamsizadeh, Z., Gholipour, S., and Nikaeen, M. (2022) The air-borne antibiotic resistome: Occurrence, health risks, and future directions. *Sci Total Environ* **804**: 150154.
- Haig, C.W., Mackay, W.G., Walker, J.T., and Williams, C. (2016) Bioaerosol sampling: sampling mechanisms, bioefficiency and field studies. *J Hosp Infect* **93**: 242.
- Han, Y., Yang, T., Chen, T., Li, L., and Liu, J. (2019) Characteristics of submicron aerosols produced during aeration in wastewater treatment. *Sci Total Environ* **696**: 134019.
- He, P., Wu, Y., Huang, W., Wu, X., Lv, J., Liu, P., et al. (2020) Characteristics of and variation in airborne ARGs among urban hospitals and adjacent urban and suburban communities: A metagenomic approach. *Environ Int* **139**: 105625.
- Hendriksen, R.S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., et al. (2019) Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun* **10**: 1–12.
- Hervàs, A., Camarero, L., Reche, I., and Casamayor, E.O. (2009) Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe. *Environ Microbiol* **11**: 1612–1623.
- Heseltine, E. and Rosen, J. (2009) DAMPNESS AND MOULD World Health Organization Regional Office for Europe.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W., and Hauser, L.J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**: 119.
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., et al. (2017) CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* **45**: D566–D573.
- Kim, K.H., Kabir, E., and Jahan, S.A. (2018) Airborne bioaerosols and their impact on human health. *J Environ Sci (China)* **67**: 23.
- King, P., Pham, L.K., Waltz, S., Sphar, D., Yamamoto, R.T., Conrad, D., et al. (2016) Longitudinal Metagenomic Analysis of Hospital Air Identifies Clinically Relevant Microbes. *PLoS One* **11**: e0160124.
- De La Cruz Peña, M.J., Martinez-Hernandez, F., Garcia-Heredia, I., Gomez, M.L., Fornas, Ò., and Martinez-Garcia, M. (2018) Deciphering the Human Virome with Single-Virus

Genomics and Metagenomics. *Viruses* **10**:

- Li, J., Cao, J., Zhu, Y., Chen, Q., Shen, F., Wu, Y., et al. (2018) Global Survey of Antibiotic Resistance Genes in Air. *Environ Sci Technol* **52**: 10975–10984.
- Li, J., Zhou, L., Zhang, X., Xu, C., and Dong, L. (2016) Bioaerosol emissions and detection of airborne antibiotic resistance genes from a wastewater treatment plant. *Atmos Environ* **124**: 404–412.
- Li, N., Chai, Y., Ying, G.G., Jones, K.C., and Deng, W.J. (2020) Airborne antibiotic resistance genes in Hong Kong kindergartens. *Environ Pollut* **260**:
- Mainelis, G. (2020) Bioaerosol sampling: Classical approaches, advances, and perspectives. *Aerosol Sci Technol* **54**: 496–519.
- Martinez-Hernandez, F., Fornas, O., Lluesma Gomez, M., Bolduc, B., de la Cruz Pena, M.J., Martinez, J.M., et al. (2017) Single-virus genomics reveals hidden cosmopolitan and abundant viruses. *Nat Commun* **8**: 15892.
- Menzel, P., Ng, K.L., and Krogh, A. (2016) Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun* **7**: 1–9.
- Napoli, C., Marcotrigiano, V., and Montagna, M.T. (2012) Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres.
- Nazir, R., Shen, J.P., Wang, J.T., Hu, H.W., and He, J.Z. (2017) Fungal networks serve as novel ecological routes for enrichment and dissemination of antibiotic resistance genes as exhibited by microcosm experiments. *Sci Reports* **7**: 1–13.
- Prussin, A.J., Garcia, E.B., and Marr, L.C. (2015) Total Virus and Bacteria Concentrations in Indoor and Outdoor Air. *Environ Sci Technol Lett* **2**: 84.
- Rinke, C., Low, S., Woodcroft, B.J., Raina, J.-B., Skarshewski, A., Le, X.H., et al. (2016) Validation of picogram- and femtogram-input DNA libraries for microscale metagenomics. *PeerJ* **4**:
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., et al. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci Total Environ* **447**: 345–360.
- Salter, S.J., Cox, M.J., Turek, E.M., Calus, S.T., Cookson, W.O., Moffatt, M.F., et al. (2014) Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* **12**: 1–12.
- Smith, D.L., Joly, D.L., Mattei, B., Punja, Z.K., Collyer, D., Scott, C., et al. (2019) Pathogens and Molds Affecting Production and Quality of Cannabis sativa L. **10**:
- Staley, J.T. and Konopka, A. (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321–346.
- Stärk, K.D.C. (1999) The Role of Infectious Aerosols in Disease Transmission in Pigs. *Vet J* **158**: 164–181.

- Ulyantsev, V.I., Kazakov, S. V., Dubinkina, V.B., Tyakht, A. V., and Alexeev, D.G. (2016) MetaFast: fast reference-free graph-based comparison of shotgun metagenomic data. *Bioinformatics* **32**: 2760–2767.
- Ventola, C.L. (2015) The antibiotic resistance crisis: causes and threats. *P T J* **40**: 277–83.
- Wu, D., Jin, L., Xie, J., Liu, H., Zhao, J., Ye, D., and Li, X. (2022) Inhalable antibiotic resistomes emitted from hospitals: metagenomic insights into bacterial hosts, clinical relevance, and environmental risks. *Microbiome* **2022 101 10**: 1–16.
- Yang, F., Gao, Y., Zhao, H., Li, J., Cheng, X., Meng, L., et al. (2021) Revealing the distribution characteristics of antibiotic resistance genes and bacterial communities in animal-aerosol-human in a chicken farm: From One-Health perspective. *Ecotoxicol Environ Saf* **224**: 112687.
- Yang, T., Jiang, L., Bi, X., Cheng, L., Zheng, X., Wang, X., and Zhou, X. (2022) Submicron aerosols share potential pathogens and antibiotic resistomes with wastewater or sludge. *Sci Total Environ* **821**: 153521.
- Yilmaz, S., Allgaier, M., and Hugenholtz, P. (2010) Multiple displacement amplification compromises quantitative analysis of metagenomes. *Nat Methods* **2010 712 7**: 943–944.
- Yooseph, S., Andrews-Pfannkoch, C., Tenney, A., McQuaid, J., Williamson, S., Thiagarajan, M., et al. (2013) A Metagenomic Framework for the Study of Airborne Microbial Communities. *PLoS One* **8**: e81862.
- Zhang, A.N., Gaston, J.M., Dai, C.L., Zhao, S., Poyet, M., Groussin, M., et al. (2021) An omics-based framework for assessing the health risk of antimicrobial resistance genes. *Nat Commun* **2021 121 12**: 1–11.
- Zhao, Y., Wang, Q., Chen, Z., Mao, D., and Luo, Y. (2021) Significant higher airborne antibiotic resistance genes and the associated inhalation risk in the indoor than the outdoor. *Environ Pollut* **268**: 115620.
- Zhou, F. and Wang, Y. (2013) Characteristics of Antibiotic Resistance of Airborne Staphylococcus Isolated from Metro Stations. *Int J Environ Res Public Health* **10**: 2412.

SECCIÓN 4: CONCLUSIONES



Conclusiones

- En el estudio del resistoma del cuerpo humano se analizaron un total de $9,1 \times 10^7$ proteínas provenientes de 771 muestras del Proyecto del Microbioma Humano, encontrando 28714 GRA que se agruparon en 235 tipos diferentes de GRA. La comparación de la abundancia de genes de resistencia a antibióticos en las muestras de individuos sanos del Proyecto del Microbioma Humano mostró que en las fosas nasales hay más abundancia metagenómica de GRA (1,86 GRA/Mb) que en otras partes del cuerpo estudiadas (vagina, piel, cavidad oral y sistema digestivo). Por otra parte, es en el sistema digestivo donde encontramos la mayor riqueza de GRA, a pesar de que mostrara la menor abundancia de genes de resistencia a antibióticos, que se atribuyó a que las especies bacterianas resistentes en esta parte del cuerpo dentro del conjunto del microbioma intestinal eran poco abundantes.
- Las bacterias resistentes a antibióticos del cuerpo humano fueron en su mayoría comensales y con un único GRA, detectándose al menos una bacteria resistente en el 99% de las 771 muestras analizadas. Las bacterias del sistema digestivo humano son las principales portadoras de GRA en aguas urbanas.
- El análisis de diferentes muestras de la ciudad de Alicante (114 Gb de datos) indicó que desde ambientes urbanos hay transporte de GRA a otros ambientes por medio del aire y agua, aunque según nos alejamos de los puntos calientes de dispersión, encontramos menor abundancia y riqueza de GRA.
- Se observó una amplia variabilidad en la abundancia de GRA de la fracción procariota tanto para los datos no ensamblados (2,5-23 GRA/Mb) como ensamblados (0,003-6 GRA/Mb) en las aguas de Alicante. En todos los casos, la abundancia de GRA en la fracción vírica fue entre 27 y 180 veces menor. Encontramos, aunque de manera poco frecuente, la presencia de GRA en segmentos genómicos de virus de ADN y ninguno en los genomas víricos de ARN. Por tanto, si añadimos que los virus de ADN suelen ser específicos de un solo tipo de huésped, el conjunto de los virus estudiados no parecería representar una amenaza relevante para la dispersión de GRA.
- Existe una relación entre los tipos más frecuentes de GRA presentes en el aire y en el agua de las ciudades de Alicante, teniendo en común los genes de resistencia de las clases multi-antibióticos, MLS (Macrólidos-Lincosamidas-Estreptomicinas), beta-lactámicos y tetracilinas. Además, tanto en agua como aire se encontró la presencia del gen *vanY* (resistencia a glucopéptidos), clasificado como de alto riesgo para la salud humana ya que tiene una alta movilidad entre un amplio abanico de huéspedes.

- Se observó una influencia entre el consumo de antibióticos y la resistencia a los mismos tanto para las muestras del Proyecto del Microbioma Humano como para las aguas de Alicante, dado que entre el 51-61% de los GRA encontrados se agruparon en las clases de antibióticos más recetadas.
- El uso de la metagenómica y experimentos de microcosmos en efluentes de agua residual mostraron que la aplicación del antibiótico de último recurso polimixina B parece no aumentar la presencia de genes de resistencia a antibióticos en aguas depuradas, pero sí altera las poblaciones bacterianas y aumenta la liberación de vesículas que tienen el potencial de transmitir GRA. Aunque los genes de resistencia a la polimixina fueron muy poco abundantes en la fracción procariota (0,018% del total de ARG), es llamativo que en la fracción viral fueron más frecuentes (0,5%-0,8% del total de ARG).
- La aplicación de la dPCR sobre dos GRA modelo proporcionó datos precisos sobre el número de copias en las aguas de Alicante del gen de resistencia *sul2* (que varía entre 21 y 11271 copias/ng DNA extraído) y del gen *tetW* (entre 7 y 18662 de copias/ng DNA extraído). Según los datos de dPCR, la abundancia de GRA de *sul2* y *tetW* podría representar entre 4×10^9 - 7×10^{10} copias/L de agua de la entrada de la depuradora. Comparando estos datos con los obtenidos *in silico* por metagenómica para ambos genes, vemos como ambas metodologías muestran una tendencia similar en las abundancias, siendo probablemente más preciso los datos de dPCR.
- En las muestras de aire analizadas (40 Gb) de distintos puntos de la ciudad de Alicante se encontraron bacterias, hongos y un virus con GRA en su material genético, siendo una posible explicación a la presencia de GRA detectados en las fosas nasales humanas. Es en el aire de la depuradora dónde mayor abundancia de GRA encontramos. En el aire de la recepción del hospital encontramos la mayor riqueza de GRA analizados (106 GRA diferentes en 108 m³). La mayor abundancia de GRA en ambientes cerrados comparados con ambientes abiertos resalta la importancia de ventilar ya que como hemos demostrado anteriormente, las fosas nasales son un punto caliente de GRA en el cuerpo humano, y por tanto una probable puerta de entrada y salida de GRA.
- El estudio metagenómico de más de 250 ambientes prístinos reveló que es extremadamente infrecuente la adquisición de GRA dispersados desde ambientes en bacterias autóctonas de ambientes prístinos.
- Para la correcta implementación de la metagenómica como una herramienta de monitorización estandarizada en sistemas de vigilancia epidemiológica de GRA, es necesario llegar a un consenso en el uso de umbrales y programas que faciliten la comparación y el análisis de los datos bioinformáticos entre laboratorios y hospitales. Un ejemplo claro es la detección de genes esenciales o *housekeeping*

donde una única mutación puntual puede determinar la resistencia a antibióticos (ej. *gyrA*), lo que podría dar lugar a falsos positivos, ya que escaparían del umbral conservador comúnmente usado de un 90% de identidad de secuencia con las bases de datos de GRA.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante