



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"



POSEIDON

Proyecto de Organismos Explicados en Diferentes Entornos



Universidad
de La Laguna



SECCIÓN DE
BIOLOGÍA

FACULTAD
DE CIENCIAS

Departamento de Bioquímica,
Microbiología, Biología Celular
y Genética

Microorganismos aerotransportados en el Océano Atlántico.

Zoraida Santana Arocha

Tutorizado por: José Manuel González y Jesús M. Arrieta

Grado en Biología

Septiembre, 2019

Índice

Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción	2
1.1 Papel ecológico de los microorganismos aerotransportados	2
1.2 Cuantificación de microorganismos en el aire	2
1.3 Campaña oceanográfica POSEIDON.....	3
2. Objetivos	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivo específico.....	4
3. Material y métodos.....	5
3.1 BioSampler.....	5
3.2 Arduino	6
3.3 Muestreo.....	7
3.4 Citometría de flujo	8
3.5 Pérdidas por reaerosolización. Diseño experimental	10
3.6 Análisis de datos.....	10
4. Resultados y discusión	13
4.1 Abundancias de microorganismos transportados por aire en mar abierto.....	13
4.2 Control de pérdida de partículas por re-aerosolización.....	15
5. Conclusiones	17
6. Bibliografía	21

Agradecimientos

En primer lugar, debo agradecer a Txetxu la oportunidad de dejarme participar en su campaña POSEIDON, sin la cual no habría sido posible la existencia de este trabajo hoy. Por su paciencia, confianza, las ganas de transmitir sus conocimientos y, sobre todo por dar oportunidades con los ojos cerrados para que podamos aprender, practicar y equivocarnos.

A la familia que elegí, mis amigos, que sin ellos la carrera no ha sido tan cuesta arriba gracias a infinitos momentos vividos a su lado. A Sara y a Carla, por esas noches (y días) infinitas aprendiendo nombres y procesos sin ton ni son, por los cafés, por las noches en el TEA, por no dejar que me derrumbara y acabar haciéndome reír o enfadar. De verdad gracias no habría sido lo mismo sin ustedes.

A mis progenitores que han hecho grandes esfuerzos para que al finalizar la defensa de este trabajo de fin de grado pueda llamarme bióloga. Gracias por la paciencia.

Resumen

Los microorganismos marinos y terrestres pueden ser aerosolizados y transportados a distancias de miles de kilómetros desde su lugar de origen. Este tipo de dispersión favorece la diversidad de microbios tanto marinos como terrestres. La información sobre los microorganismos aerotransportados sobre océanos y mares libres de influencias terrestre (islas y costas) es limitada con respecto a otros tipos de ambientes naturales. El presente trabajo se ha llevado a cabo durante la campaña oceanográfica POSEIDON. En esta campaña se ha optimizado el método de muestreo y de recuento directo para su uso como método alternativo de recuento de microorganismo en el aire. Los valores que se han obtenido oscilan entre 10^2 y 10^5 microorganismos por m^3 de aire.

Abstract

Marine and terrestrial microorganisms can be aerosolized and transported thousands of kilometers from its origin. This type of dispersion favours the diversity of marine and terrestrial microbes. Information about airborne microorganisms over oceans and seas free of terrestrial influences (islands and coasts) is limited compared to other types of natural environments. This work was carried out during the oceanographic campaign POSEIDON. In this campaign, the method of sampling and counting has been optimised for use as an alternative method of counting microorganisms in the air. The values obtained range from 10^2 to 10^5 microorganisms per m^3 of air.

1. Introducción

En la atmósfera habitan gran cantidad de microorganismos entre los que se encuentran bacterias, arqueas, virus y esporas de hongos (Mayol et al., 2017). La diversidad de organismos se ve favorecida por procesos como el transporte del polvo de origen terrestre, formación de espray y el estallido de burbujas en la superficie del océano, estos permiten que una porción de los microorganismos tanto terrestres como marinos se liberen hacia la atmósfera (Andreas, Edson, Monahan, Rouault, & Smith, 1995). La mayoría de los estudios de transporte de los microorganismos sobre los sistemas acuáticos se refieren a ecosistemas de agua dulce o a localizaciones costeras, siendo muy escasos los estudios en mar abierto escasos cuando nos referimos a estudios en mar abierto (Mayol, Jiménez, Herndl, Duarte, & Arrieta, 2014).

Sin embargo, el océano abierto es probablemente una de las fuentes principales de microorganismos atmosféricos y el destino final de estos microorganismos aerotransportados, ya que los océanos cubren más del 70% de la superficie terrestre. En este sentido, Mayol et al. 2017 estimaron que el 33% y el 68 % de los microorganismos presentes en la atmósfera sobre los océanos tiene un origen marino.

1.1 Papel ecológico de los microorganismos aerotransportados

Se considera que los microorganismos que habitan en la atmósfera juegan un importante papel en procesos climáticos como la formación de nubes al actuar como núcleos de condensación (CNN) y también en la formación de cristales de hielo (núcleos heterogéneos de hielo, IN) (Bauer et al., 2003). Además, también contribuyen al mantenimiento de la diversidad microbiana del océano ya que al ser transportados por las corrientes atmosféricas (Mayol et al., 2014), éstos pueden ser dispersados a lo largo de miles de kilómetros en unos días, permitiendo tanto el transporte transcontinental como el transoceánico (Kellogg & Griffin, 2006).

1.2 Cuantificación de microorganismos en el aire

Existen diferentes colectores que han sido utilizados en estudios previos. En algunos casos se utilizan filtros y en otros, sistemas más sofisticados como los colectores de colisión, colectores ciclónicos y los colectores de impacto. Estos colectores se fabrican comercialmente para el estudio de la calidad del aire tanto en ámbitos hospitalarios como en empresas, y más recientemente para la detección de armas biológicas y evaluación de amenazas de bioterrorismo. En el presente estudio utilizaremos un captador ciclónico

convencional. Este captador se ha utilizado para el control de patógenos en hospitales y en edificios habitados entre otros ambientes (Li et al., 2018), pero no se ha utilizado prácticamente en estudios de campo dada la relativa baja abundancia de microorganismos. La pérdida de partículas es muy común durante las tareas de recolección (Riemenschneider et al., 2010), debido a la evaporación o aerosolización; por eso la importancia de ser cuantificada para así, obtener datos de abundancias más precisos. La reaerosolización es el proceso por el cual se pueden perder las partículas recolectadas de nuevo hacia la atmósfera, resultando en una infraestimación de la abundancia real.

1.3 Campaña oceanográfica POSEIDON

Este estudio se llevó a cabo durante la campaña POSEIDON, asociada al proyecto del mismo nombre cuyo investigador principal es Jesús M. Arrieta, científico titular del Instituto Español de Oceanografía. Aunque este proyecto está centrado en la utilización de materia orgánica disuelta en el océano profundo, el trazado de la campaña era ideal para recolectar muestras en mar abierto (Fig. 1.), y se aprovechó la ocasión para realizar estimas de abundancias de los microorganismos aerotransportados en zonas remotas del Océano Atlántico.

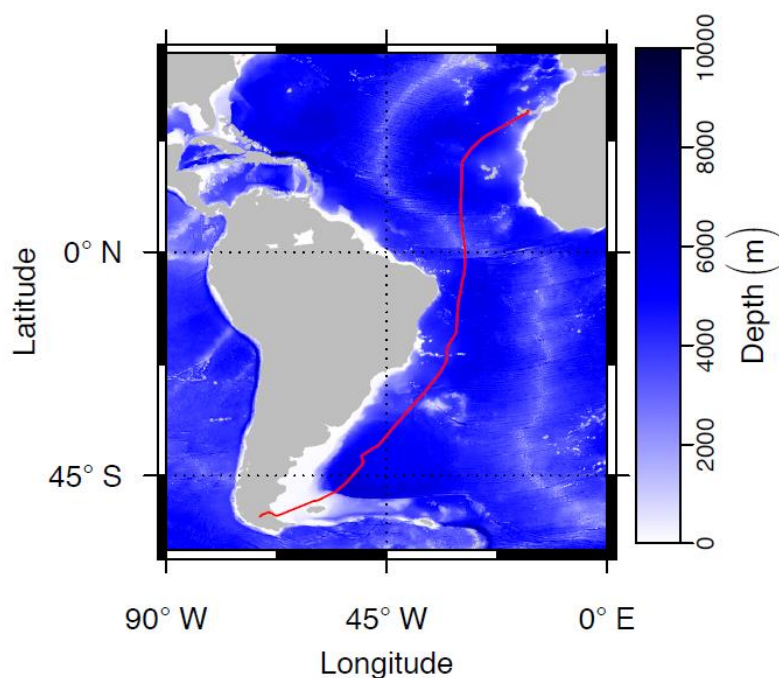


Fig. 1. Transecto campaña POSEIDON 2019.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Estimar la abundancia de microorganismos del aire en el Océano Atlántico subtropical mediante una adaptación de un captador comercial disponible (BioSampler SKC).

2.2 Objetivo específico

Mejorar la capacidad de captación del BioSampler SKC, aumentando el volumen de aire muestreado y evitando la contaminación.

Poner a punto el recuento de microorganismos mediante citometría de flujo en estas muestras de baja abundancia.

Estimar las correcciones oportunas para pérdidas por reaerosolización y poner a punto un procedimiento optimizado del muestreo para su uso en posteriores campañas oceanográficas.

3. Material y métodos

3.1 BioSampler

BioSampler (Fig. 2.) es un colector de aire por medio del cual se obtiene un volumen de líquido donde se depositan microorganismos y pequeñas partículas presentes en la atmósfera. Este colector está formado por 3 piezas de vidrio, una superior donde se encuentra la apertura para la entrada de aire, una media en la cual se encuentra una boquilla donde colocar una manguera para que realice vacío y, por último, la pieza inferior donde se encuentra el medio colector (20 ml de agua MiliQ). En esta zona, el agua por medio del vacío realiza efecto vórtex, y el diseño del aparato permite una entrada de aire constante de 12,5 L/min, de modo que las bacterias se depositan sobre una pequeña película de agua que circula por las paredes del depósito inferior.

Para retirar partículas y bacterias de las paredes del colector se debe sumergir en HCl 1% durante unas horas antes de su puesta en marcha para reducir al máximo la presencia de bacterias en el colector antes del muestro.



Fig. 2. SKC BioSampler en condiciones controladas en laboratorio del I.E.O. Tenerife.

Se le ha acoplado una veleta al sistema para controlar su activación y desactivación durante el transecto a estudiar. Así, cuando reciba aire desde proa se pondrá en funcionamiento y comenzará la recolección, en caso de cambiar la dirección del viento,

el colector dejará de funcionar evitando la contaminación con aire conteniendo microorganismos y otras partículas procedentes del buque.

Además de la veleta, también se ha equipado con un dispositivo GPS para saber la posición inicial y final de la recolección de aire, y un temporizador para calcular el volumen total de aire filtrados.

Para compensar la pérdida por evaporación durante la toma de muestra, se realizó una estima del volumen evaporado. De acuerdo con esta estima cada 5 minutos el colector se rellenará con 100 μ l de agua MiliQ.

3.2 Arduino

El control de GPS y de la bomba de vacío y su activación mediante la veleta se implementó mediante una placa Arduino UNO[®]. Arduino es una plataforma de creación electrónica de código abierto, tanto hardware como software, que simplifica el control de pequeños aparatos electrónicos.

En este estudio lo hemos usado para diseñar una plataforma que permita poner en funcionamiento el captador cuando reciba la señal de activación de la veleta, reponer el líquido evaporado en el colector y, grabar las posiciones en las que el captador estuvo activo.

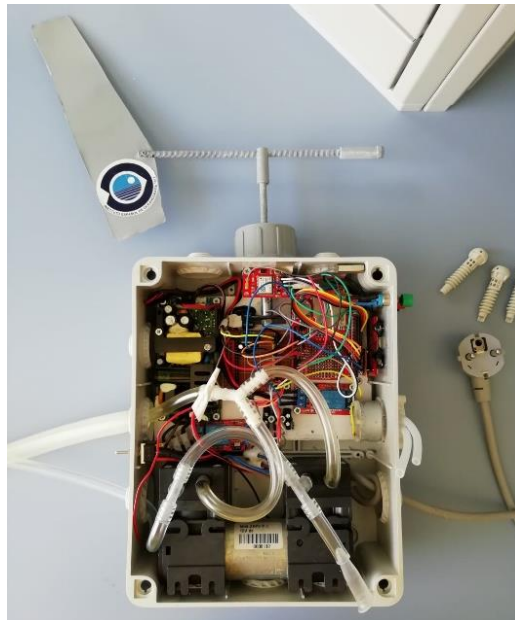


Fig. 3. Disposición de Arduino junto a veleta y diseño interior con bomba de vacío para la aspiración de aire y bomba peristáltica para reponer el líquido evaporado.

3.3 Muestreo

La toma de muestras se llevó a cabo en distintas estaciones (Fig. 4.) en mar abierto a lo largo del recorrido de la campaña POSEIDON, que tuvo lugar a bordo del Buque Oceanográfico Sarmiento de Gamboa (Fig. 5.) desde el día 23 de marzo hasta el 31 de marzo de 2019.

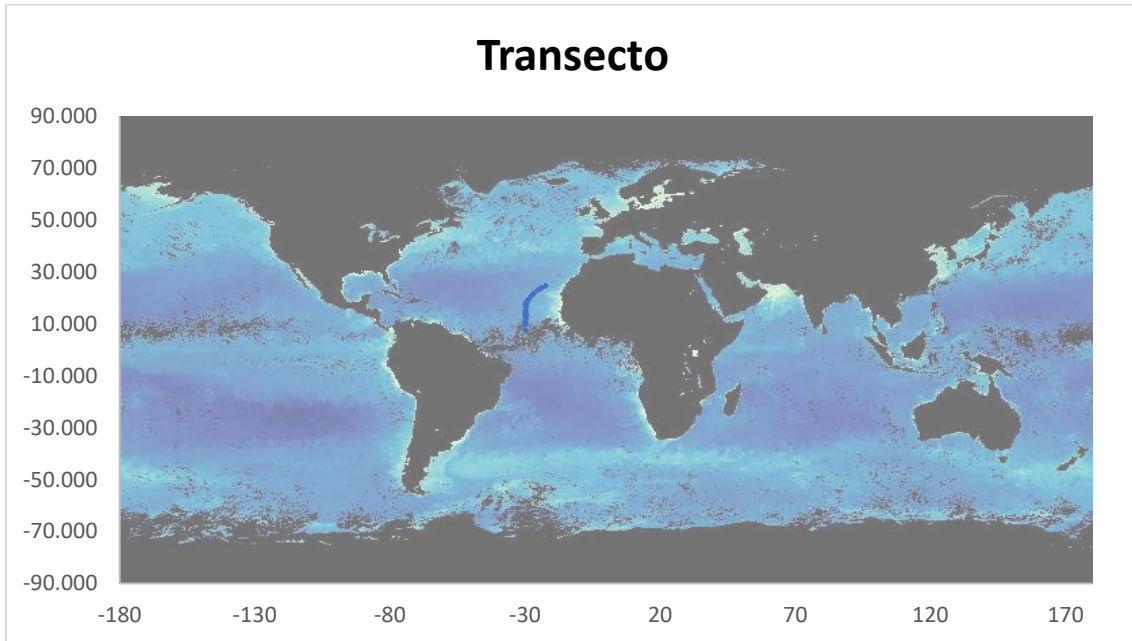


Fig. 4. Transecto de obtención de muestras aprovechando la ruta estipulada para el proyecto POSEIDON.



Fig. 5. Buque Oceanográfico Sarmiento de Gamboa.

Durante la campaña se recogieron un total de 20 muestras en un rango aproximado de 18.1 grados latitudinales, desde 5.9° N hasta 24° N.

Los datos de las fechas, horas, latitudes y longitudes a las que se tomaron las muestras fueron obtenidos por medio del continuo colector de datos del B/O Sarmiento de Gamboa.

BioSampler se colocará en proa y a babor, en la zona superior adyacente a la cubierta de tripulación a una altura de 10.60 metros (puntal) sobre el nivel del mar. Mediante el sistema de control diseñado, el BioSampler comenzará a tomar aire cuando el barco reciba viento desde proa, activado por medio de la veleta que acompaña al sistema. Con respecto a las horas de filtración, éstas varían cada día en función de la dirección del viento, de las horas de parada en estación y de algunos problemas técnicos que surgieron al fallar el relé de activación de la bomba de vacío.

Al finalizar las horas de toma de aire, se debe tomar alícuotas de 1,5 ml para su posterior procesado en el citómetro de flujo, de modo que en tubos Eppendorf se colocará la muestra junto a 0,15 ml de paraformaldehído (PFA) al 10% para fijar la muestra y evitar el crecimiento bacteriano.

3.4 Citometría de flujo

Se ha hecho uso del citómetro BD Accuri C6 Plus (Fig. 6.) a bordo del buque. La citometría de flujo permite estudiar las abundancias de microorganismos mediante fluorescencia. El flujo de muestra pasa por medio de dos flujos de agua Mili-Q, por la que se forma una banda que permite que la muestra circule en una dirección siempre siguiendo una trayectoria. Así, las células pasan de forma ordenada registrándose de forma individualizada la información de sus características; además, los orgánulos intracelulares también difractan los rayos, no sólo la superficie celular, de modo que obtenemos un amplio rango de características celulares como el tamaño, complejidad, rugosidad, etc.

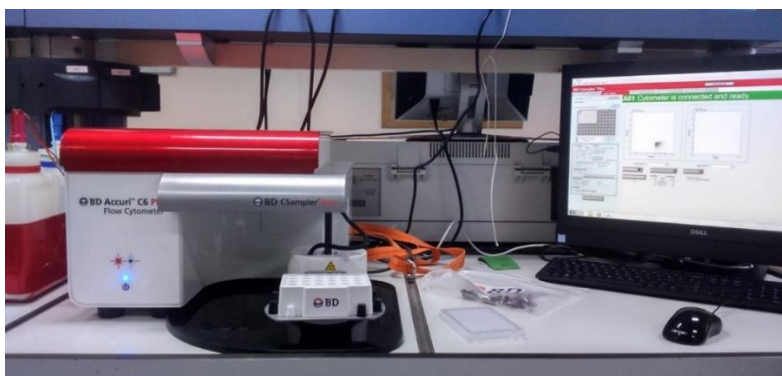


Fig. 6. Citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus en B/O Sarmiento de Gamboa.

Cuando un flujo de muestra pasa (Fig. 7.), las partículas que se encuentran en ella son interceptadas por un láser cuya luz se puede desviar en función de las características de las partículas. Esa luz llega a diferentes sensores que son los encargados de registrar la

información en forma de luz; la información de la complejidad de las partículas es proporcionada por el sensor SSC (*side scatter*) localizado a 90° de la zona por donde circula el flujo, y el sensor FWD (*forward scatter*) proporciona información del tamaño, localizado en la misma dirección que el láser.

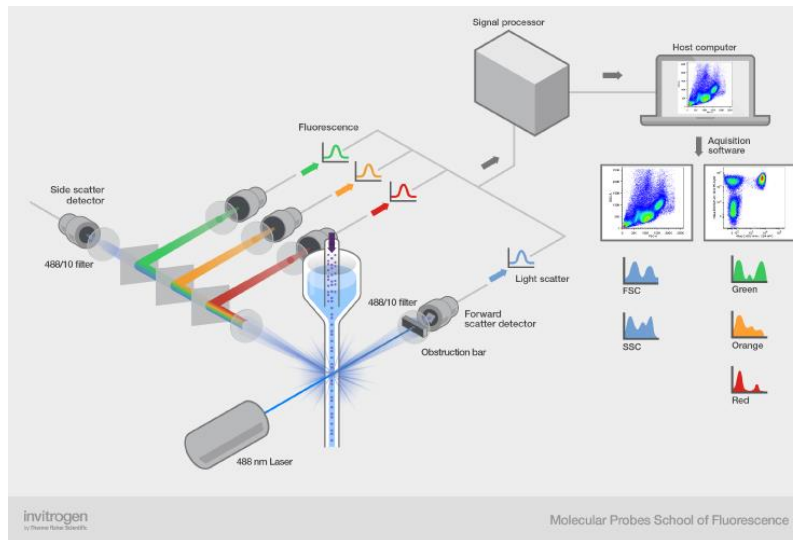


Fig. 7. Fundamento citometría de flujo.

La citometría se realizó siempre en muestras de 1.5 ml fijadas con paraformaldehído (1% concentración final), teñidas con SYBRGreen I[®] a la concentración final recomendada por el fabricante y después de añadir además de 37.5 µl de una solución de microesferas fluorescentes en un citómetro de flujo (Accuri C6 Plus). Aunque este citómetro calcula el volumen de muestra procesado directamente y por tanto no necesita de la solución de microesferas fluorescentes para estimar el volumen de muestra, estas microesferas permiten tener un control adicional del volumen procesado y de posibles variaciones en la intensidad de la fluorescencia medida por el instrumento. Los triplicados de los tubos con muestra y los blancos instrumentales tomados del agua Mili-Q libre de microorganismos utilizada para rellenar el muestreador y compensar por la evaporación en el mismo día se procesaron a la vez, alternando blancos y muestras para verificar la correcta limpieza del instrumento entre muestras y eliminar la posibilidad de contar bacterias provenientes de una contaminación interna en cualquiera de los pasos de muestreo y contaje.

3.5 Pérdidas por reaerosolización. Diseño experimental

Tras haber estado en HCl 1% el BioSampler se deja secar y se procede a enrasar la zona del colector con 20 ml de agua Mili-Q, se le debe añadir una proporción de microesferas (1 micra de diámetro), 10 µl de microesferas por 400 µl de Mili-Q, éstas se encuentran ya teñidas con una sustancia fluorescente para facilitar la cuantificación por medio de citometría de flujo. Una vez pesado el colector con el volumen final de 20 ml (Mili-Q + microesferas), se pesa y se toma una muestra de 400 µl que se coloca en un tubo Eppendorf enumerado.

Se vuelve a añadir 400 µl al colector, pero esta vez de agua Mili-Q para poder hacer comparaciones de 20 ml en todas las muestras. Se pone en marcha el colector y se deja filtrando aire durante 5 minutos, una vez ha finalizado, se pesa y se vuelve a tomar una muestra de 400 µl para colocarlo en un tubo Eppendorf. Esto se llevará a cabo durante una hora a intervalos de 5 minutos tomando muestras de 400 µl, obtenido por tanto datos desde el tiempo 0 (T0) hasta T60.

Este tipo de experimento se realizará por triplicado, por lo que finalmente se obtendrán 13 muestras por cada experimento, con un total de 39 muestras. Por medio de estos datos, se puede cuantificar la eventual reaerosolización de las partículas en el colector.

3.6 Análisis de datos

Los resultados obtenidos durante la campaña y los obtenidos en el laboratorio del Centro Oceanográfico de Canarias se someten a una serie de cálculos para facilitar la interpretación de forma visual.

Abundancias en mar abierto.

La siguiente tabla (Tabla 1.) se ha añadido con valores necesarios para la realización de los cálculos, permitiendo así un mayor entendimiento de los cálculos que se llevarán a cabo en todas las muestras.

Tabla 1. Ejemplo de datos de la muestra 2.

Muestras	Bacterias	Células/ml	Valor del blanco	Volumen muestra	Células totales	Volumen aire (m ³)
2a	84	84	10.33	25	258.33	3.921
2b	76	76				
2c	69	69				
Blanco 2a	62	62				
Blanco 2b	70	70				
Blanco 2c	54	54				

Sabiendo que las muestras están triplicadas se realiza el cálculo del valor del blanco con sus triplicados. Se hace mediante la resta del valor promedio de las abundancias para una misma muestra, menos el valor promedio de los valores de blanco de una misma muestra.

Por medio de la multiplicación del valor del blanco por el volumen de muestra que queda en el medio colector se obtiene el número de células totales. La estimación de la media de células por m³ se calculará dividiendo el número de células totales medidas en cada muestra, por el volumen de aire captado en m³. En algunas muestras se ha hecho uso de la siguiente fórmula para una mejor estima de los volúmenes de aire que se han tomado.

$$\text{Litros} = H' * 12.5 \text{ L/min} * 60$$

Donde H' son las horas de recolección, 12.5 es el volumen estándar que recoge BioSampler y 60, los minutos que tiene una hora. Los volúmenes obtenidos mediante fórmula solo se usarán en caso de no tener los datos del día.

La desviación estándar (DS) se calculará a partir de los recuentos totales obtenidos para cada uno de los triplicados dividiendo por el volumen de aire muestreado por el colector.

Prueba estadística (t de student)

Para verificar que los valores obtenidos son significativamente diferentes del valor de los blancos, es decir, si hay diferencias entre los valores de la media de muestra y la media de los blancos, se ha hecho uso de la prueba t-Student para calcular el nivel de significación de los resultados.

Se realiza en Excel haciendo uso de la prueba t-Student aplicando solo una cola. Los datos a comparar son los valores por triplicado de cada muestra y los valores por triplicado de los blancos.

Abundancias en experimentos de reaerosolización.

Para cada experimento (n = 3) se han obtenido un total de 13 muestras sin triplicar, se adjunta una tabla con dos ejemplos para una mejor comprensión de los cálculos llevados a cabo (

Tabla 22). El cálculo de los ml en el colector se hace mediante la resta del peso del colector junto al agua y las bolitas tras finalizar los 5 minutos, a 76.29 gr que corresponden al peso del vaso del colector vacío.

Los ml del colector son multiplicados por los eventos/ μ l para cada muestra y multiplicado por 1000 para obtener de este modo el número de eventos/ml. Los valores de abundancias de microesferas iniciales son calculados mediante la resta de los eventos/ml de cada muestra por el producto de multiplicar el valor de eventos/ μ l por 400 μ l (volumen de muestra analizada).

Los valores de abundancia de microesferas finales serán calculados como la resta de beads iniciales y los eventos/ml. Estos cálculos se aplicarán a todos los datos obtenidos en cada experimento.

Tabla 2. Ejemplo de obtención de valores por medio de cálculos para la pérdida de beads mediante aerosolización.

Tiempo	Peso inicial	Peso final	ml	Eventos/μl	Eventos /ml	Beads iniciales	Beads finales
0	96.06	95.81	19.52	1209	23599680	23116080	334560
5	95.82	95.37	19.08	1194	22781520	22303920	185020

4. Resultados y discusión

4.1 Abundancias de microorganismos transportados por aire en mar abierto

Los siguientes datos (Tabla 3.) se han obtenido mediante el colector BioSampler SKC, midiendo las abundancias por medio de citometría de flujo para cada una de las muestras obtenidas por triplicado.

Tabla 3. Volúmenes de aire, abundancias de microorganismos obtenidos durante la Campaña POSEIDON.

Día	Volumen de aire (m³)	Abundancias		
23.03.2019 (8:30 - 20:30)	4.545	3520	4677	4677
24.03.2019 (20:30 - 14:38)	3.921	84	76	69
24.03.2019 (14:38 - 20:19)	1.093	1344	1347	1171
24.03.2019 (20:19 - 08:20)	9.012	765	643	843
25.03.2019 (08:28 - 15:01)	4.912	1321	1368	1542
25.03.2019 (15:01 - 20:35)	4.175	274	341	412
26.03.2019 (20:35 - 09:30)	9.687	496	494	666
26.03.2019 (09:30 - 15:08)	4.225	108	97	117
26.03.2019 (15:08 - 20:37)	4.080	37	69	61
27.03.2019 (20:37 - 09:50)	9.798	152	167	67
27.03.2019 (09:50 - 14:54)	3.753	94	91	78
27.03.2019 (14:54 - 20:34)	4.196	354	31	26
28.03.2019 (09:32 - 15:35)	4.544	83	64	57
28.03.2019 (15:35 - 20:40)	3.752	388	307	439
29.03.2019 (20:40 - 08:37)	8.903	893	856	709
29.03.2019 (08:37 - 16:54)	6.132	29	25	17
30.03.2019 (20:41 - 08:19)	6.426	170	47	76
30.03.2019 (08:19 - 13:52)	4.098	416	382	602
30.03.2019 (13:52 - 19:45)	4.303	97	140	139
31.03.2019 (13:41 - 19:32)	2.870	339	290	442

Según la siguiente gráfica (Figura 8.) observamos que valores muy altos de células·m⁻³ han sido contadas mediante el citómetro. La presencia de valores altos como el primero, puede tener un gran error debido a que fue la primera toma de aire habiendo corregido

errores que se iban dando a lo largo del transecto. Los días posteriores ya no se observa gran diferencia, a pesar de observar valores en negativo como los del día 27 de marzo de 2019.

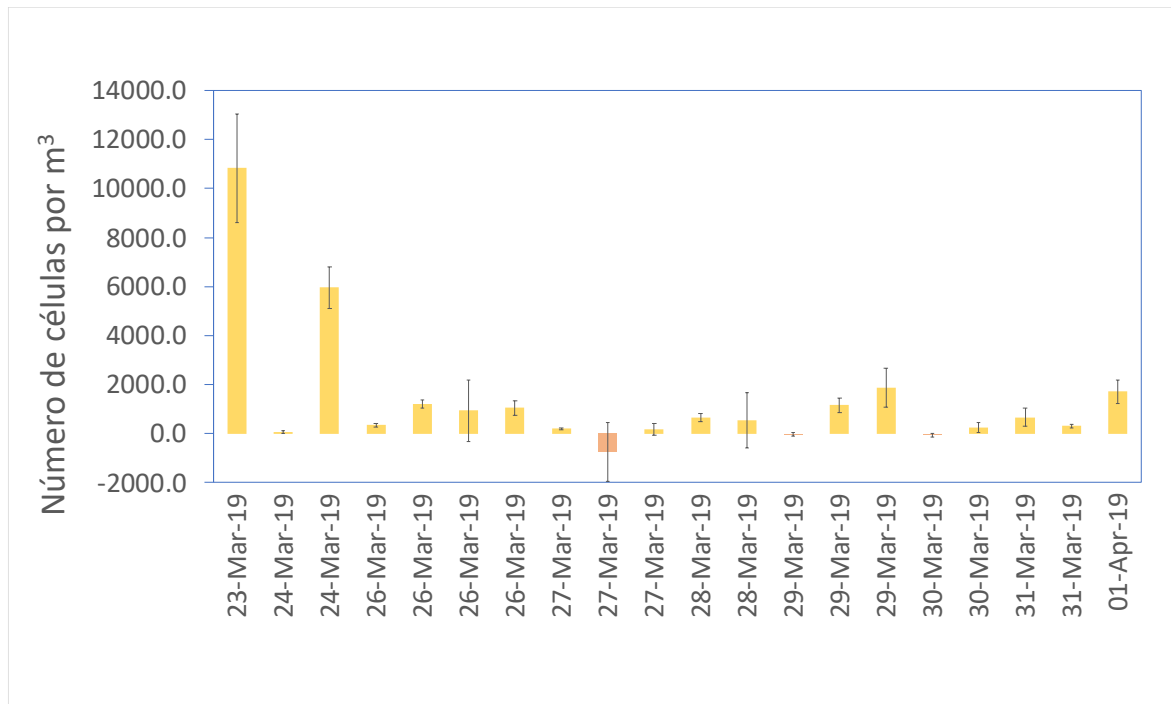


Fig. 8. Abundancias de microorganismos frente a las fechas de obtención de muestras.

Estos valores en negativo pueden darnos idea sobre nuestro método de muestreo. Quizás un mayor tiempo de muestreo habría disminuido la probabilidad de que valores negativos se observaran. Otra forma de asegurarnos la obtención de valores cercanos a lo esperado es mantener las condiciones de esterilidad y tener una buena praxis a la hora de realizar el muestreo y el conteo.

En la Figura 9. se representan las abundancias enfrentadas a la velocidad media del viento calculadas mediante los datos obtenidos de la estación meteorológica del B.O. Sarmiento de Gamboa, cabe destacar que no se observa una relación clara ente la velocidad del viento y la abundancia de células·m⁻³. Se requerirá un análisis más detallado incluyendo proximidad a fuentes terrestres (islas) y análisis de retrotrayectorias de masas de aire para explicar las variaciones observadas. En cualquier caso, los valores observados están dentro del rango observado en otros estudios previos en estas latitudes del Atlántico (Mayol et al. 2017).

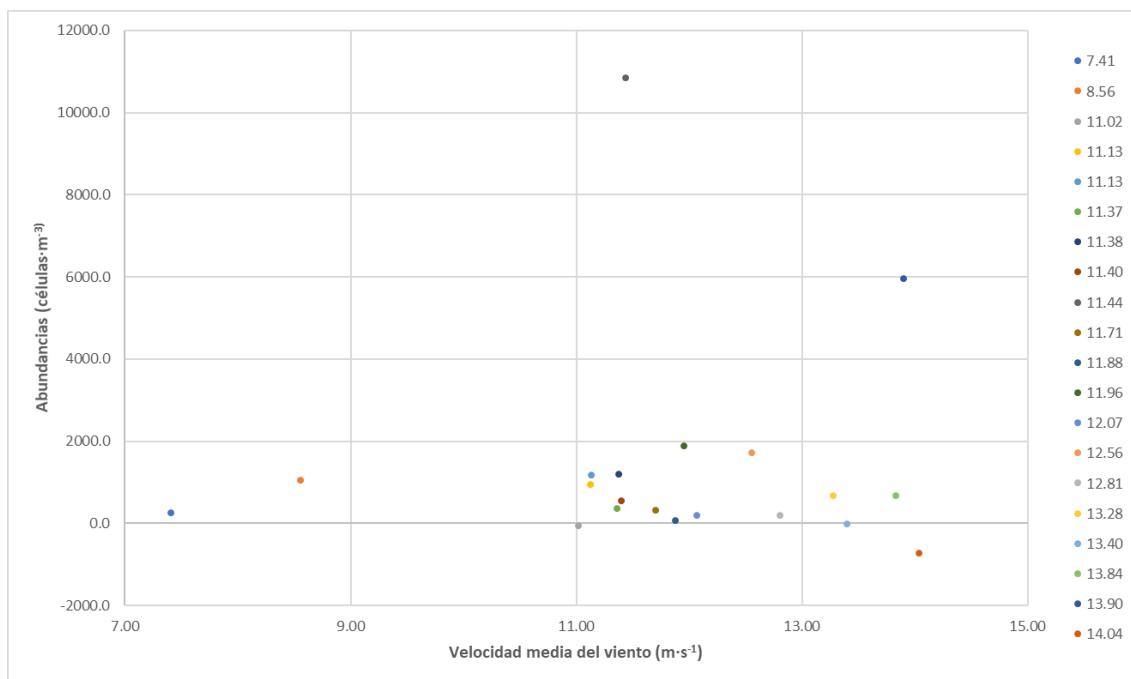


Fig. 9. Abundancias de microorganismos en función de la velocidad media del viento.

4.2 Control de pérdida de partículas por re-aerosolización

Para cada experimento se han obtenido un total de 13 muestras cuyos valores son representados en una gráfica (Figura 10.) donde se observan los valores del número de eventos y los minutos en los que se inicia el experimento.

En la gráfica se observa que los valores esperados y observados oscilan alrededor de 0, esto nos indica que las variaciones observadas son probablemente debidas a errores en la medida de la cantidad de líquido evaporado, pero claramente indican que la pérdida de partículas por aerosolización no es significativa ya que es cercana a 0, por lo que, no se llevarán a cabo correcciones y ajustes en los cálculos de abundancias de microorganismos aerotransportados en mar abierto.

En caso de que hubiéramos observado diferencias entre los valores esperados en ausencia de aerosolización y los medidos en las muestras a lo largo del tiempo, se habría necesitado implementar una corrección para estimar la cantidad de bacterias perdidas por reaerosolización pero en este caso no será necesario. Esto es probablemente debido a que el Biosampler SKC opera a velocidades de flujo muy inferiores a las de otros sistemas, de manera que se minimiza la reaerosolización.

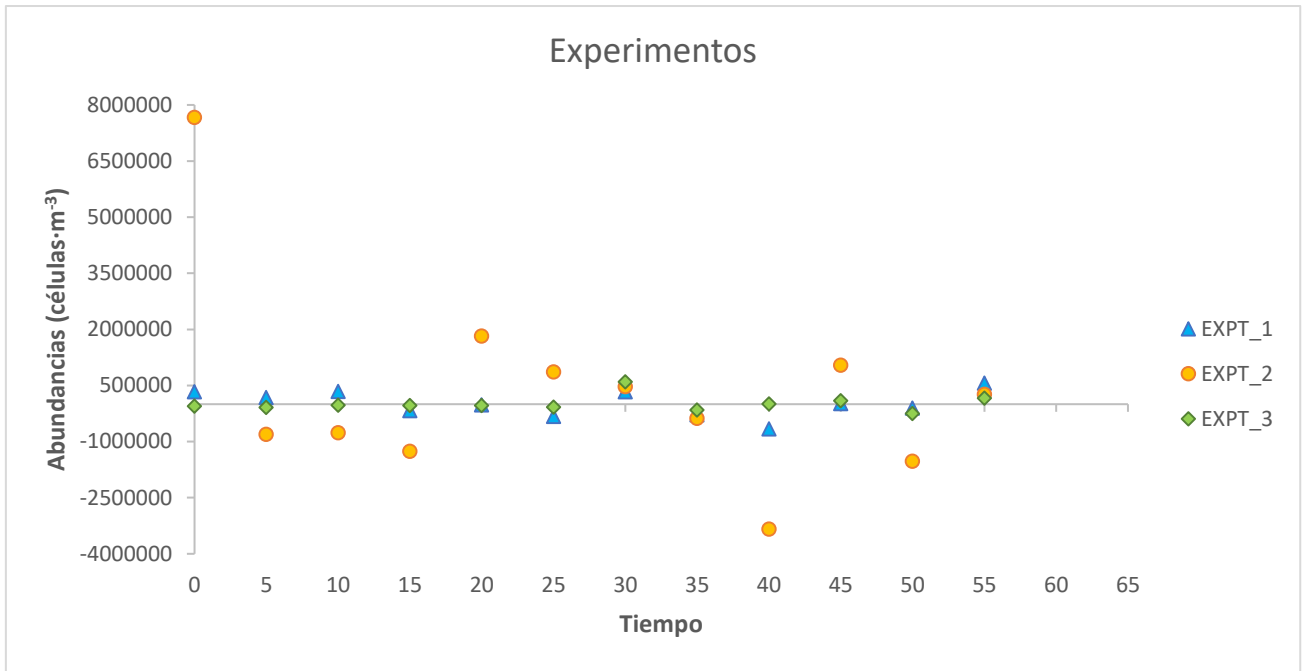


Fig. 10. Representación de abundancias (células·m⁻³) frente al tiempo para cada uno de los tres experimentos.

5. Conclusiones

En este trabajo describimos la adaptación de un sistema de muestreo convencional (BioSampler SKC) para la toma de muestras de microorganismos de la atmósfera a bordo de buques oceanográficos. Estas adaptaciones consisten en:

1. Implementar un control del muestreo por medio de una veleta para evitar contaminación desde el barco.
2. Reponer el líquido de captación, compensando la evaporación y permitiendo así el muestreo de volúmenes de aire mucho mayores.
3. Registrar la posición del barco durante el muestreo y el volumen total de aire muestreado.
4. Optimizar el recuento de muestras de baja abundancia mediante citometría de flujo

Los valores de abundancia obtenidos son significativamente distintos de los valores del blanco en la mayoría de los casos y consistentes con los observados por otros estudios en la misma zona del océano.

El coste total de los materiales utilizados para implementar el captador es aproximadamente un orden de magnitud más bajo que el de otros captadores comerciales similares.

Las conclusiones son:

1. El método de obtención de microorganismos mediante el uso del aparato comercial BioSampler SKC ha concluido ser exitosa gracias a las modificaciones en el software que han permitido corregir variables para una mejor estima.
2. La cuantificación de abundancias de microorganismos en mar abierto durante el transecto ha permitido establecer un rango de células·m⁻³ de aire que oscilan entre valores de 10² y 10⁵.
3. En este estudio no está determinada la influencia de zonas costeras y terrestres sobre la abundancia de células obtenidas en el transecto establecido para el estudio. De modo que, un posterior análisis de datos será requerido para concluir si existe influencia.

4. Los valores obtenidos para las abundancias de células·m⁻³ de aire han concluido ser en su mayoría se concluyen que son significativos debido a que $p < 0.05$. De modo que se sostiene que los valores son distintos entre sí, en casos puntuales como en la muestra 16, $p > 0.05$ siendo no significativo. Valores como este entran en el límite de detección, esto puede indicar por ejemplo que el tiempo de muestreo no ha sido suficiente. Para estos casos sería ideal llevar a cabo métodos más sensibles para evitar valores no significativos.

5. La optimización del BioSampler SKC comercial ha sido exitosa con mínimas pérdidas de partículas por aerosolización (<1%). Siendo así, este método está cualificado para ser usado en campaña oceanográficas con el fin de obtener datos sobre distintos lugares del mundo para comprender la ecología microbiana marina y entender cuál es su importancia y función a nivel marino y global.

Conclusions

In this work we describe the adaptation of a conventional sampling system (SKC BioSampler) for the sampling of microorganisms from the atmosphere on board oceanographic vessels. These adaptations consist of:

1. To implement a control of the sampling by means of a weather vane to avoid pollution from the ship.
2. Replenish the capture liquid, compensating for evaporation and thus allowing sampling of much larger volumes of air.
3. Record the position of the boat during sampling and the total volume of air sampled.
4. Optimize the count of low abundance samples by flow cytometry.

The abundance values obtained are significantly different from the target values in most cases and consistent with those observed by other studies in the same area of the ocean.

The total cost of the materials used to implement the sampler is about an order of magnitude lower than other similar commercial samplers.

The conclusions are:

1. The method of obtaining microorganisms through the use of the commercial device SKC BioSampler has been concluded to be successful thanks to the modifications in the software that have allowed to correct variables for a better estimate.
2. Abundance of microorganisms in open sea during the transect has allowed to establish a range of $\text{air} \cdot \text{m}^{-3}$ cells that oscillate between values of 10^2 and 10^5 .
3. In this study, the influence of coastal and terrestrial zones on the abundance of cells obtained in the transect established for the study is not determined. Thus, a further analysis of the data will be required to conclude whether influence exists.
4. The values obtained for the abundances of $\text{air} \cdot \text{m}^{-3}$ cells have mostly concluded to be significant because $p < 0.05$. So, it is maintained that the values are different from each other, in specific cases as in sample 16, $p > 0.05$ is not significant.

Values such as this one is outer of limit detection, this may indicate for example that the sampling time has not been sufficient. For these cases it would be better to carry out more sensitive methods to avoid non-significant values.

5. The optimization SKC BioSampler has been successful with minimal particle losses by aerosolization (<1%). Thus, this method is qualified to be used in oceanographic campaigns in order to obtain data on different parts of the world for understanding marine microbial ecology, its importance and function at the marine and global level.

6. Bibliografía

- Aller, Josephine Y., Marina R. Kuznetsova, Christopher J. Jahns, and Paul F. Kemp. 2005. "The Sea Surface Microlayer as a Source of Viral and Bacterial Enrichment in Marine Aerosols." *Journal of Aerosol Science* 36(5–6): 801–12.
- Bauer, H., Giebl, H., Hitzenberger, R., Kasper-giebl, A., Reischl, G., Zibuschka, F., & Puxbaum, H. (2003). *Airborne bacteria as cloud condensation nuclei*. 108(May), 1–5. <https://doi.org/10.1029/2003JD003545>
- DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T. L., Rodriguez-R, L. M., Barazesh, J. M., Anderson, B. E., Beyersdorf, A. J., ... Konstantinidis, K. T. (2013). Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(7), 2575–2580. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212089110>
- Han, Taewon, and Gediminas Mainelis. 2012. "Investigation of Inherent and Latent Internal Losses in Liquid-Based Bioaerosol Samplers." *Journal of Aerosol Science* 45: 58–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaerosci.2011.11.001>.
- Kellogg, C. A., & Griffin, D. W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(11), 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.07.004>
- Li, J., Leavey, A., Wang, Y., O’Neil, C., Wallace, M. A., Burnham, C. A. D., ... Biswas, P. (2018). Comparing the performance of 3 bioaerosol samplers for influenza virus. *Journal of Aerosol Science*, 115(August 2017), 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2017.08.007>
- Mayol, E., Arrieta, J. M., Jiménez, M. A., Martínez-Asensio, A., Garcias-Bonet, N., Dachs, J., ... Duarte, C. M. (2017). Long-range transport of airborne microbes over the global tropical and subtropical ocean. *Nature Communications*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00110-9>
- Mayol, E., Jiménez, M. A., Herndl, G. J., Duarte, C. M., & Arrieta, J. M. (2014). Resolving the abundance and air- sea fluxes of airborne microorganisms in the North Atlantic Ocean. *Frontiers in Microbiology*, 5(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00557>
- Spracklen, D., & Heald, C. (2013). *The contribution of fungal spores and bacteria to regional and global aerosol number and ice nucleation immersion freezing rates*. (May 2016). <https://doi.org/10.5194/acp-14-9051-2014>
- Riemenschneider, L., Woo, M. H., Wu, C. Y., Lundgren, D., Wander, J., Lee, J. H., ... Heimbuch, B. (2010). Characterization of reaerosolization from impingers in an effort to improve airborne virus sampling. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 315–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04425.x>

- Warren-rhodes, K. A., Lee, K. C., Archer, S. D. J., Cabrol, N., Ng-boyle, L., Wettergreen, D., ... Pointing, S. B. (2020). *Subsurface Microbial Habitats in an Extreme Desert Mars-Analog Environment*. *10*(February 2019), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00069>
- Wu, Y., Shen, F., & Yao, M. (2010). Use of gelatin filter and BioSampler in detecting airborne H5N1 nucleotides, bacteria and allergens. *Journal of Aerosol Science*, *41*(9), 869–879. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2010.05.006>