

Aislamiento e identificación de microorganismos aéreos

Isolation and identification of airborne microorganisms



Trabajo de Fin de Grado

AXEL ADRIÁN DELGADO BRITO

Tutorizado por:

Dra. Cristina González Martín y Dr. Mario Andrés González Carracedo

Grado en Biología.

Junio 2021

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
Historia de la Aerobiología	2
Principales factores implicados en el transporte de microorganismos en la atmósfera	2
Implicación de las tormentas de polvo en la dispersión de microorganismos por vía aérea	4
Las tormentas de polvo sahariano en Canarias	4
Hipótesis y Objetivos	6
Material y métodos	7
Toma de muestras	7
Cultivo y aislamiento de microorganismos	7
Visualización mediante microscopía óptica	8
Extracción y cuantificación del ADN	8
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	8
Electroforesis en gel de agarosa	9
Identificación de microorganismos mediante secuenciación	9
Resultados	11
Toma de muestras, siembra y aislamiento de microorganismos	11
Purificación de ADN genómico y amplificación mediante PCR del gen <i>16S rRNA</i>	14
Obtención de secuencias consenso para el gen <i>16S rRNA</i>	15
Identificación molecular de los microorganismos aislados	18
Discusión	23
Conclusiones	26
Conclusions	26
Bibliografía	27

Resumen

Los microorganismos aerotransportados pueden causar diversos efectos sobre los ecosistemas, y las tormentas de arena originadas en zonas desérticas funcionan como una de las principales vías de transporte. En este trabajo, se ha abordado la identificación de bacterias presentes en muestras de aire recogidas tanto en condiciones climáticas normales como durante periodos con presencia de calima. La selección de filtros procedentes de estos muestreos fue utilizada como material de partida para el cultivo de microorganismos, y las bacterias aisladas fueron caracterizadas micromorfológicamente. Posteriormente, se realizó una extracción de ADN, seguida de la amplificación mediante PCR y secuenciación del gen *16S rRNA* para su identificación molecular. Las secuencias obtenidas permitieron identificar el 90% de las bacterias, la mayoría del género *Bacillus*, pero también se identificaron bacterias pertenecientes a los géneros *Alkalihalobacillus*, *Brevibacterium*, *Cytobacillus*, e incluso algunas especies nuevas, dentro de los géneros *Cytobacillus*, *Mesobacillus* y *Bacillus*. Sólo uno de los géneros, *Staphylococcus*, estuvo presente exclusivamente en las muestras tomadas durante días sin influencia de calima. Sin embargo, son necesarios más estudios para caracterizar detalladamente las comunidades microbianas presentes en el aire, así como las diferencias existentes entre ambas condiciones climáticas.

Abstract

Airborne microorganisms can cause diverse effects over the ecosystems, and dust storms from desert areas act as a major transport route. In this work, a bacterial analysis was performed from air samples, collected under dust and non-dust weather conditions. Selected filters from different samplings were used to cultivate microorganisms, and isolated bacteria were visualized using microscopy for their morphological identification. Subsequently, DNA extraction was carried out, followed by *16S rRNA* amplification and sequencing for their molecular identification. Obtained sequences allowed the identification of 90% of the isolated bacteria, being mostly included in the *Bacillus* genus, but also in *Alkalihalobacillus*, *Brevibacterium*, and *Cytobacillus* genera. Moreover, some new species, within *Cytobacillus*, *Mesobacillus* and *Bacillus* genera have been found. Only one genus, *Staphylococcus*, was exclusive for non-dust days samples. More studies are necessary to properly identify the airborne bacterial communities in detail, and to assess the differences between these two climatic conditions.

Introducción

Historia de la Aerobiología

En la década de 1930, Fred C. Meier definió la Aerobiología como una disciplina científica que estudia los microorganismos y las partículas biológicas presentes en el aire (Gregory, 1961; Meier & Lindbergh, 1935). Sin embargo, la introducción de este término fue el resultado de varios trabajos previos, que comenzaron en las últimas décadas del siglo XIX. Pierre Miquel, considerado como el padre de la aerobiología, desarrolló el primer muestreador de aire en 1879. Algunos años después, realizó los primeros estudios en este campo, en los que llevó a cabo una recogida de muestras de aire en el Atlántico y el Mediterráneo, concluyendo que la abundancia de microorganismos disminuía conforme las muestras se alejaban de la costa (Miquel & Moreau, 1884).

Ya en la primera década del siglo XX, Miquel y Cambert recogieron muestras de aire en distintas partes del mundo, a distinta altura y en diferentes épocas del año, concluyendo que el número de microorganismos presentes en cada muestra varía según diversos factores, como la temperatura, la altitud o la humedad (Miquel & Cambert, 1901). Este estudio confirmó la hipótesis planteada previamente por Pasteur, quien había propuesto que la cantidad de microorganismos disminuía con la altura, en base a una toma de muestras de aire repartida desde la orilla del río Jura (Francia) hasta unos 2.000 metros de altura en el pico Mont (Gregory, 1961). Desde entonces hasta la actualidad, han sido numerosos los estudios científicos que han tratado de identificar los microorganismos presentes en el aire.

Principales factores implicados en el transporte de microorganismos en la atmósfera

Hoy sabemos que los microorganismos son prácticamente ubicuos en la atmósfera terrestre, aunque su distribución y diversidad varía en función de la localización geográfica (Delort *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2009). Además de la temperatura, el viento, la humedad o las precipitaciones, la abundancia y distribución de los microorganismos en el aire depende también de las fuentes de emisión (Burrows *et al.*, 2009; Delort *et al.*, 2010; Knutsen *et al.*, 2012), del modo en que se transporten, de sus mecanismos de supervivencia, los distintos usos del suelo, la cobertura superficial o la composición de la atmósfera (Bowers *et al.*, 2011; Fröhlich-Nowoisky *et al.*, 2012; Jones & Harrison, 2004).

Respecto a las fuentes de emisión, se calcula que la concentración de bacterias en los suelos del planeta está en torno a 10^6 microorganismos por gramo de suelo, mientras que en las aguas superficiales de los océanos se estima entre $10^5 - 10^6$ por cm^3 . Estas bacterias pueden ser aerosolizadas por ráfagas de aire, sobre todo cuando alcanzan una velocidad superior a $6 \text{ m} \times \text{seg}^{-1}$, siendo transportadas tanto a cortas como a largas distancias (Seifried *et al.*, 2015).

Algunos de los factores que reducen la viabilidad de estos microorganismos son principalmente la exposición a la luz ultravioleta, la escasa cantidad de nutrientes y la deshidratación (Griffin, 2004), aunque también existen otros que favorecen su supervivencia, como pueden ser las tormentas de polvo. De hecho, un estudio realizado por la NASA ha puesto de manifiesto que la incidencia de la luz ultravioleta puede decaer a la mitad en el interior de las tormentas de polvo, gracias al alto volumen de material particulado que transportan (Herman *et al.*, 1999). Además, es frecuente que las bacterias aisladas a partir de muestras de aire presenten pigmentación, ya que esta característica protege frente a la incidencia de los rayos ultravioletas (Herman *et al.*, 1999).

Aunque muchos de estos microorganismos pierden su viabilidad durante este transporte, algunos son capaces de resistir las condiciones extremas y alcanzar nuevos nichos, incluso a mucha distancia del punto de emisión (Kellogg & Griffin, 2006). Por otra parte, se ha demostrado que muchas bacterias, especialmente Gram-positivas, en condiciones desfavorables son capaces de permanecer en un estado de latencia hasta que las condiciones del medio se vuelven favorables (Herman *et al.*, 1999). La capacidad de estos microorganismos de resistir condiciones extremas se ha comprobado en trabajos en los que se analizaron muestras de aire tomadas a veinte kilómetros de altura en la atmósfera (Griffin, 2004; Smith *et al.*, 2010). En ellos, aunque no se detectó un crecimiento y diversidad abundantes, se identificaron colonias viables del género *Bacillus* y de varios hongos (Griffin, 2004; Smith *et al.*, 2010).

Por lo tanto, el transporte de microorganismos a través de grandes masas de aire podría suponer un riesgo para la salud humana, dado que existe la posibilidad de que algunas especies patógenas puedan alcanzar nuevas poblaciones (Dominguez-Rodriguez *et al.*, 2020).

Implicación de las tormentas de polvo en la dispersión de microorganismos por vía aérea

Uno de los factores más importantes que afectan a la distribución y viabilidad de los microorganismos en la atmósfera son las llamadas tormentas de polvo, conocidas popularmente en Canarias como “calima”. Se trata de un fenómeno meteorológico que se origina en zonas áridas y desérticas de algunas partes del planeta, levantando toneladas de partículas de polvo y transportándolo a largas distancias desde el punto de origen, especialmente debido a las condiciones geográficas de estas zonas y a la escasa vegetación que presentan (López *et al.*, 2006). Las masas de aire procedentes de África pueden atravesar el Océano Atlántico y alcanzar América del Sur y el Caribe, incluso una semana después, gracias a los vientos Alisios. Además, dependiendo de la época del año, puede alcanzar otras regiones, como el norte de Europa a través del mar Mediterráneo, o el área de Oriente Próximo (Kellogg & Griffin, 2006; Prospero *et al.*, 2005; Querol *et al.*, 2009).

Gracias a sensores en satélites como el TOMS (*Total Ozone Mapping Spectrometer*, EEUU) o el OMI (*Ozone Monitoring Instrument*, EEUU) se ha podido determinar las regiones de las que proviene el polvo atmosférico a nivel mundial. El Norte de África (Sáhara-Sahel), Oriente Medio y Asia Central son las tres fuentes más importantes y, en menor medida, América del Sur (desierto de Atacama, Chile), África del Sur y Australia (De Longueville *et al.*, 2010; Engelstaedter *et al.*, 2006; Goudie, 2009; Schwanghart & Schütt, 2008; Tegen *et al.*, 2012). Aproximadamente, la mitad del polvo emitido a la atmósfera procede de la región Sáhara-Sahel, desde donde se estima una emisión de entre 250 y 2888 Tm al año (Huneus *et al.*, 2011). Debido a que estas fuentes de polvo están ubicadas en zonas donde hay poca o nula actividad humana la movilización del polvo a través de la atmósfera está causada principalmente por cambios en las condiciones ambientales (Prospero *et al.*, 2002).

Las tormentas de polvo sahariano en Canarias

El archipiélago canario se encuentra a 100 – 500 km de la costa oeste africana y esto hace que las intrusiones de aire sahariano sean frecuentes. Se estima que 1 de cada 4 días hay calima en Canarias, aunque esta estimación es variable, tanto en número de

intrusiones como en intensidad (Pérez *et al.*, 2019). En muchas ocasiones, el aire sahariano llega de una forma tan intensa que repercute drásticamente en el medio natural de las islas (Goudie & Middleton, 2001). Un ejemplo son los incendios forestales, que en un alto porcentaje están influenciados por las altas temperaturas y el ambiente seco asociado a estas intrusiones (Dorta, 2001). Además, estos fenómenos provocan repercusiones socioeconómicas, ya que pueden afectar al transporte aéreo al disminuir drásticamente la visibilidad, con el efecto sobre el turismo que esto conlleva, o incluso a la producción agronómica de las islas, con el consiguiente impacto económico derivado de la pérdida de cultivos (Dorta *et al.*, 2005).

Además, recientemente se ha demostrado que la calima causa un efecto importante sobre la salud humana, incrementando el riesgo de morbimortalidad por enfermedades cardiovasculares y exacerbando las afecciones respiratorias (Dominguez-Rodriguez *et al.*, 2020; Sánchez-Lerma *et al.*, 2009). Gorbushina y colaboradores analizaron muestras de polvo sahariano recogidas en el Atlántico por Darwin en 1838 (Gorbushina *et al.*, 2007). Mediante análisis geoquímicos, los autores confirmaron que las muestras procedían del oeste del Sahara siendo capaces de recuperar microorganismos viables, alcanzando concentraciones superiores a 10^4 UFC x g⁻¹ (Gorbushina *et al.*, 2007), proporcionando una clara evidencia que demuestra que las tormentas de polvo sahariano, transportan microorganismos altamente resistentes, que podrían estar alcanzando Islas Canarias.

Estudios previos en Tenerife identificaron parte de los genomas de algunos virus patógenos humanos en muestras de aire, como *Rotavirus* y *Enterovirus* (Gonzalez-Martin *et al.*, 2018). También se ha observado cómo la concentración de bacterias y hongos, entre ellos algunas especies patógenas, aumenta durante los episodios de calima (Teigell-Pérez, 2015; Mazar *et al.*, 2016), lo que concuerda a su vez con los últimos resultados obtenidos tras el estudio del microbioma de dos puntos de muestreo en Tenerife donde se ha observado que la diversidad es mayor en zonas de muestreo de alta montaña, mientras que en zonas urbanas predomina la presencia de microorganismos ligados a la actividad antropogénica (González-Martín *et al.*, 2021).

Hipótesis y Objetivos

En base a lo anteriormente descrito, la hipótesis que se plantea en el presente estudio consiste en que **la abundancia y diversidad de bacterias presentes en la atmósfera canaria puede verse afectada por la presencia de polvo en suspensión procedente del desierto del Sahara.**

Por lo tanto, como objetivo principal del presente trabajo, se ha propuesto **analizar la presencia de bacterias en muestras de aire tomadas bajo condiciones climáticas normales y en presencia de calima.** Para desarrollar este objetivo, se han planteado varios objetivos específicos:

1. Llevar a cabo una selección sistemática de filtros procedentes de muestreos atmosféricos disponibles en el laboratorio, incluyendo episodios de estabilidad ambiental y episodios de calima.
2. Realizar el cultivo y aislamiento de las bacterias presentes en los filtros seleccionados en el punto anterior, así como su identificación morfológica.
3. Llevar a cabo la identificación molecular de las bacterias aisladas, mediante secuenciación de la región codificante para la subunidad 16S del ARN ribosómico y comparación de las secuencias en bases de datos específicas.
4. Determinar si existen diferencias, a nivel de género y especie, entre las bacterias identificadas en ambas condiciones climáticas.

Material y métodos

Toma de muestras

Las muestras fueron recogidas de manera rutinaria por el personal del Laboratorio de Física Médica y Radiactividad Ambiental (FIMERALL), que forma parte de los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de La Laguna (SEGAI - ULL). El muestreo se realizó mediante un equipo Saic Radecco AVS-28A, con un flujo de 35 L/min (similar a la respiración humana), usando filtros de celulosa de 47 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro. El equipo funciona aspirando aire de forma ininterrumpida durante las 24 horas y los filtros se retiran cada 7 días para su análisis en el laboratorio.

Cultivo y aislamiento de microorganismos

Para llevar a cabo el cultivo de microorganismos, la mitad de cada filtro fue colocado sobre una placa con medio de cultivo nutritivo general Triptona Soja Agar (Scharlab, España), durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se retiró el filtro y las placas fueron incubadas en una estufa (Thermo Fisher scientific, EEUU) a 36 °C durante 24 horas. Como control negativo, se procesó un filtro estéril en paralelo al resto de muestras.

Cada 24 horas de incubación, las placas fueron fotografiadas y se seleccionaron todas las colonias que mostraran diferencias morfológicas y que estuvieran más alejadas entre sí, para evitar posibles contaminaciones a la hora de llevar a cabo el aislamiento. Cada microorganismo fue identificado en función del código del filtro al que correspondía y el número de aislado. Este proceso se repitió como máximo durante 7 días, o bien hasta que no se observó crecimiento de nuevas colonias en la placa. Cada uno de los microorganismos seleccionados, fue aislado utilizando un punzón estéril, sembrado en una nueva placa conteniendo el mismo medio de cultivo fresco e incubado nuevamente a 36°C durante 24 horas para obtener un cultivo puro.

Parte de la biomasa obtenida en las placas fue transferida a dos tubos, conteniendo cada uno 200 μl de medio líquido Caldo Triptona Soja (Scharlab, España). Uno de ellos fue incubado en la estufa a 36°C durante 24 horas, para llevar a cabo la posterior extracción de ADN genómico. Al segundo tubo, se le añadió 86 μl de 100% glicerol

estéril, y se almacenó en el congelador a -80°C , por si fuera necesario volver cultivar el microorganismo asilado.

Visualización mediante microscopía óptica

Para llevar a cabo una identificación morfológica inicial, se procedió a la visualización de cada microorganismo asilado mediante microscopía óptica, empleando un Microscopio DM750 (Leica, Estados Unidos). Para ello, se recogió una muestra de biomasa procedente del cultivo puro y se dispersó en una gota de agua colocada sobre un portaobjetos. Tras colocar el cubreobjetos, se procedió a su observación a diferentes aumentos. En algunos casos se empleó una tinción con azul de lactofenol, con el objetivo de identificar la posible presencia de hongos y poder estudiar con más detalle la morfología celular. En todos los casos, se hicieron fotografías para posteriormente diferenciar la morfología de las bacterias que se examinaron.

Extracción y cuantificación del ADN

La extracción de ADN genómico se realizó empleando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto en el primer paso del protocolo, que consistió en la lisis bacteriana. La modificación consistió en sustituir el tampón de lisis proporcionado con el kit por tampón 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100, incluyendo además 20 mg/ml de lisozima (Merck, Alemania) que fue añadida justo antes de utilizar el tampón de lisis.

Una vez finalizada la extracción de ADN, se procedió a su cuantificación en un espectrofotómetro DeNovix DS-11+ (DeNovix, EEUU). Además de la medida de concentración, se estimó la pureza de las preparaciones de ADN genómico, utilizando los coeficientes de absorbancia 260/280 y 260/230.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En el presente trabajo, se emplearon cebadores degenerados, que permiten llevar a cabo la amplificación del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosómico (*16S rRNA*) en prácticamente todos los géneros de bacterias, generando un fragmento de aproximadamente 1,5 Kb (Brosius *et al.*, 1978). Estos cebadores son conocidos comúnmente como 27F (5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') y 1492R (5' -

GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'), debido a la localización de sus regiones complementarias en el gen *16S rRNA* de *Escherichia coli* (Kanagawa, 2003). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador *Verity Thermal Cycler* (Applied Biosystems, EEUU), y para la preparación de cada reacción de PCR se utilizó el kit *VWR Taq DNA-polymerase* (VWR, EEUU). Cada reacción fue preparada en un volumen final de 20 µl incluyendo 1 µl de ADN genómico, 0,2 mM de cada cebador, 0,2 µM de nucleótidos trifosfato (Promega, EEUU), 1X Key Buffer (VWR, EEUU) y 0,05 U/µl de *Taq DNA-polymerase* (VWR, EEUU).

La cantidad de ADN genómico que se utilizó como molde en cada reacción de PCR, varió según la concentración obtenida para cada muestra, oscilando en un rango entre 2 y 20 ng totales por reacción. Las condiciones de amplificación consistieron en un solo ciclo de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 20 segundos a 53°C y 1 minuto a 72°C. Finalmente, se incluyó un paso de elongación de 10 minutos a 72 °C.

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron fraccionados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X. Para la visualización de los ácidos nucleicos en el gel, se añadió 2 µl de 20.000X RealSafe (REAL, España), por cada 100 ml de gel. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas de desarrollo horizontal *Mini-Sub* (BioRad, EEUU), aplicando 100 voltios durante 30-50 minutos.

Los geles de electroforesis fueron visualizados utilizando el lector de geles *ChemiDoc XRS⁺ System* (BioRad, EEUU), empleando una longitud de onda de 340 nm. El tamaño de los productos amplificados se determinó comparando las bandas observadas en las muestras con el marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Promega, EEUU).

Identificación de microorganismos mediante secuenciación

Los productos de PCR fueron preparados según las instrucciones descritas por la empresa MacroGen (Madrid, España) y enviados mediante mensajería para su procesamiento. Para cada producto de PCR, se prepararon dos muestras para su

secuenciación, cada una conteniendo uno de los cebadores que habían sido previamente utilizados para la amplificación.

Una vez recibidos los resultados, se utilizó el programa *Chromas V2.6.6* (Technelysium, Australia) para la visualización de los electroferogramas correspondientes a las secuencias *forward* (FW) y *reverse* (RV) obtenidas para cada producto de PCR. Las secuencias fueron inspeccionadas manualmente para eliminar aquellas regiones presentes en ambos extremos que presentaran baja calidad para la identificación de bases. Seguidamente, fueron alineadas con el servidor *Clustal EMBOSS Needle* (Sievers *et al.*, 2011). Tras llevar a cabo el alineamiento, se obtuvo una secuencia consenso única para cada muestra, a partir de la cual se calculó el porcentaje de solapamiento de ambas lecturas.

Cada secuencia consenso se utilizó para llevar a cabo una búsqueda en la base de datos *EzBioCloud* (Yoon *et al.*, 2017), restringiendo la búsqueda al subconjunto de secuencias de referencia para el gen *16S rRNA*. El siguiente criterio de restricción fue seleccionar únicamente los 10 primeros resultados obtenidos para cada búsqueda. Además, solamente se tuvieron en cuenta aquellos resultados en los que el porcentaje de cobertura era superior al 90%, y el porcentaje de identidad fue igual o superior al 95%. A la hora de definir la asignación a nivel de especie, se tuvo en cuenta al menos un 99% de homología, mientras que para nivel de género se asumió al menos un 98% de identidad (Johnson *et al.*, 2019; Schlaberg *et al.*, 2012; Woo *et al.*, 2009). De manera complementaria, se llevó a cabo una búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, 1990) en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), restringiendo la búsqueda al subconjunto de secuencias de referencia para el gen *16S rRNA*.

Resultados

Toma de muestras, siembra y aislamiento de microorganismos

El personal de FIMERALL (SEGAI-ULL), lleva a cabo un muestreo rutinario mediante filtración atmosférica en la isla de Tenerife (Santa Cruz de Tenerife, 28°27'21.3''N 16°17'20.6''W), por lo que el primer paso de este trabajo consistió en realizar una selección de 5 filtros procedentes de tres condiciones climáticas distintas. Se incluyeron dos filtros muestreados durante dos episodios de calima distintos (C₁ y C₂), un filtro muestreado la semana siguiente a la finalización de un episodio de calima (P), y dos filtros procedentes de muestreos bajo condiciones ambientales de ausencia de calima (AC₁ y AC₂) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Filtros seleccionados en el presente estudio.

Condiciones ambientales	ID. filtro	Fechas de muestreo		Nº aislados
Presencia de calima	C ₁	24-08-20	31-08-20	8
	C ₂	21-12-20	28-12-20	4
Posterior a calima	P	20-07-20	27-07-20	6
Ausencia de calima	AC ₁	30-11-20	07-12-20	11
	AC ₂	14-12-20	21-12-20	10

Tras llevar a cabo la siembra inicial de cada uno de los filtros en medios de cultivo (**Fig. 1**), en todos los casos se observó crecimiento en cultivo mixto de diferentes microorganismos. Como control negativo, de manera paralela al resto de muestras se sembró un filtro estéril sin haber sido sometido a muestreo ambiental, y no se observó crecimiento alguno, lo que descarta la presencia de contaminación durante la manipulación en el laboratorio



Figura 1. Crecimiento en placas de TSA de los microorganismos en cultivo mixto, obtenidos a partir de la siembra de los filtros indicados tras 24 horas de incubación a 36°C. **P** (Posterior a calima), **C** (Presencia de calima), **AC** (Ausencia de calima), y **C-** (control).

Sin embargo, es importante destacar que los filtros presentaban una cierta tonalidad oscura, lo que podría estar causado por presencia de contaminación atmosférica, principalmente acumulación de CO, NO₂, Pb y compuestos orgánicos volátiles, derivados de emisiones de vehículos (Palmgren *et al.*, 1999). Esta variable podría afectar a los resultados del presente trabajo, ya que la contaminación química podría perjudicar la viabilidad de ciertas especies de microorganismos que se hubieran recogido en los filtros.

El número de colonias bacterianas que pudieron ser aisladas a partir de cada filtro osciló entre 4 y 11. Sin embargo, el número de bacterias aisladas a partir de los filtros en condiciones de ausencia de calima (21 aislados) fue casi el doble que el número de aislados en condiciones de calima (12 aislados) (**Tabla 1**). En total, se obtuvieron 39 aislados y los resultados del aislamiento se muestran en la **Figura 2**. Un primer análisis morfológico de las colonias a nivel visual no reveló diferencias significativas en la mayoría de los casos, aunque en ciertos aislados si fue posible observar características morfológicas específicas (**Tabla 2**).

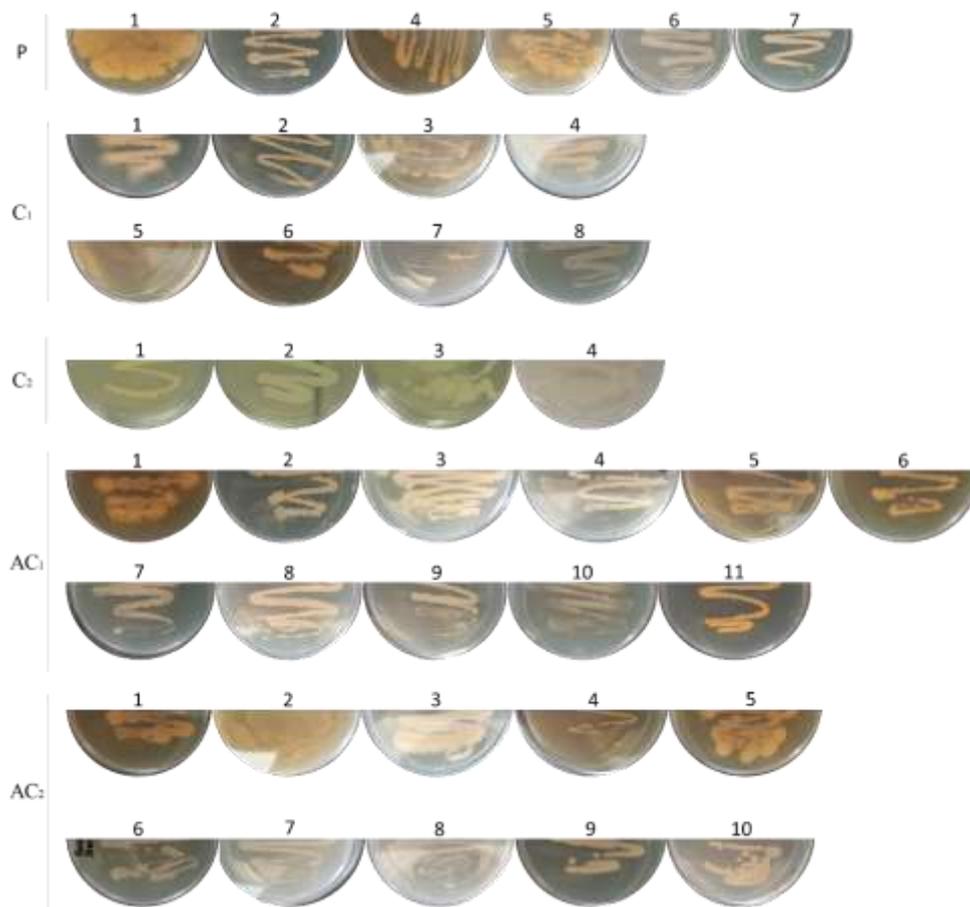


Figura 2. Crecimiento de las colonias aisladas en cultivo puro a partir de los distintos filtros. Se muestran imágenes de cada placa con medio TSA, obtenidas tras 24 horas de incubación a 36°C.

Tabla 2. Identificación morfológica de las colonias aisladas.

Morfología	P	C ₁	C ₂	AC ₁	AC ₂
Colonias lisas de color blanco	6	2, 7, 8	1, 2	7, 8, 9, 10, 11	8, 9, 10
Colonias difusas	1, 5	3, 6	3, 4	1, 2, 5, 6	1
Colonias con bordes irregulares	2, 4, 7	1, 4, 5	---	3, 4	2, 3, 4, 5, 6, 7

P (Posterior a calima), **C** (Presencia de calima), **AC** (Ausencia de calima)

Este análisis morfológico preliminar permitió identificar tres morfologías predominantes, caracterizando 14 colonias lisas de color blanco, 11 colonias de morfología difusa y 14 colonias con bordes irregulares (**Tabla 2**). En general, las colonias lisas blancas y las colonias irregulares dominaron en condiciones climáticas normales, (8 aislados de cada tipo), respecto a las condiciones con presencia de calima, (5 y 3 aislados, respectivamente), mientras que el número de colonias difusas fue similar en ambas condiciones.

Seguidamente, se procedió a visualizar las bacterias mediante microscopía óptica, para tratar de identificar más diferencias morfológicas entre ellas, así como para discriminar la posible presencia de hongos y levaduras que pudieran haber sido aislados (**Fig. 3**).

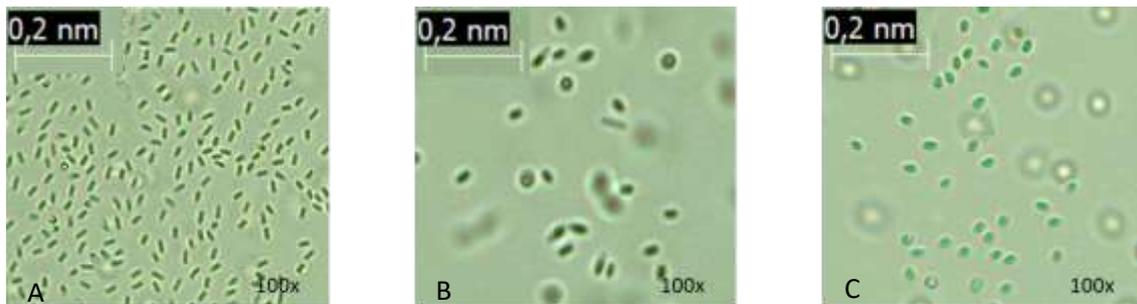


Figura 3. Imágenes de microscopía óptica. A: muestra P.7; B: muestra C₁.4; C: muestra AC₂.1. Todas las imágenes se han obtenido al mismo aumento (100X) y se presentan en la misma escala.

En este caso se identificaron hasta siete tipos morfológicos diferentes (**Tabla 3**). De esta manera, fue posible agrupar las colonias según su morfología, lo que permitió identificar 9 Bacilo-cocos verdes, 5 Bacilo-cocos verdes oscuros, 3 Bacilo-cocos verdes en racimos, 9 Bacilos verdes, 3 Bacilos verdes formando dímeros o cadenas, 8 Bacilos verdes con pared celular visible y 2 Cocos en racimos (**Tabla 3**).

Tabla 3. Identificación morfológica al microscopio de las bacterias aisladas.

Descripción microscopio	Muestras P	Muestras C ₁	Muestras C ₂	Muestras AC ₁	Muestras AC ₂
Bacilo-cocos verdes	1	6	1, 2	6, 7	1, 2, 7
Bacilo-cocos verdes oscuros	4, 5	1, 4, 5	---	---	---
Bacilo-cocos verdes en racimos	---	---	---	---	4, 5, 6
Bacilos verdes	7	2, 7, 8	---	1, 8, 9, 10	9
Bacilos verdes formando dímeros o cadenas	2, 6	---	---	---	10
Bacilos verdes con pared celular visible	---	3	3, 4	2, 3, 4, 5	3
Cocos en racimos	---	---	---	11	8

Este análisis permitió identificar una mayor diversidad morfológica en las muestras recogidas en ausencia de calima (6 tipos morfológicos), al compararlas con las muestras recogidas en condiciones de calima y post-calima (4 tipos). De hecho, dos tipos morfológicos fueron exclusivos de las muestras con ausencia de calima, incluyendo tanto Bacilo-cocos verdes en racimos como Cocos en racimos (**Tabla 3**). Sorprendentemente, los Bacilo-cocos verde oscuros solo fueron descritos en las muestras recogidas en presencia de calima y en el periodo post-calima, pero no en condiciones ambientales de estabilidad.

Purificación de ADN genómico y amplificación mediante PCR del gen *16S rRNA*

Una muestra de un cultivo procedente de cada microorganismo aislado fue almacenada en el laboratorio a -80°C , y el resto fue utilizado para llevar a cabo una extracción de ADN genómico. En todos los casos, se obtuvo una cantidad de ADN genómico muy superior a la necesaria para llevar a cabo la amplificación del gen *16S rRNA* mediante PCR. Como promedio, la concentración de ADN fue $26,3 \pm 19,5$ ng/ μl , donde la concentración mínima que se obtuvo fue de 4,4 ng/ μl (muestra AC₂.7), y la concentración máxima fue de 187,64 ng/ μl (muestra C₁.8).

La pureza de las preparaciones de ADN genómico oscilará en función de cada aislado, especialmente en el caso del coeficiente 260/230, que generalmente presentó valores más bajos de lo esperado, con un promedio de $1,4 \pm 0,8$. En el caso del coeficiente 260/280, se observaron mejores resultados, con un promedio de $1,58 \pm 0,36$.

Las muestras de ADN genómico fueron diluidas adecuadamente en función de su concentración, y se utilizaron para la amplificación del gen *16S rRNA*. En todos los casos, el resultado de la PCR fue satisfactorio, ya que se obtuvo un fragmento amplificado del tamaño esperado (1,5 Kb), aunque el rendimiento de la PCR varió según la muestra de ADN genómico (**Fig. 4**). Como control negativo de la PCR, se incluyó una reacción con agua en lugar de ADN genómico, y en este caso no se observó amplificación, lo que permitió confirmar la ausencia de contaminación (**Fig. 4**).

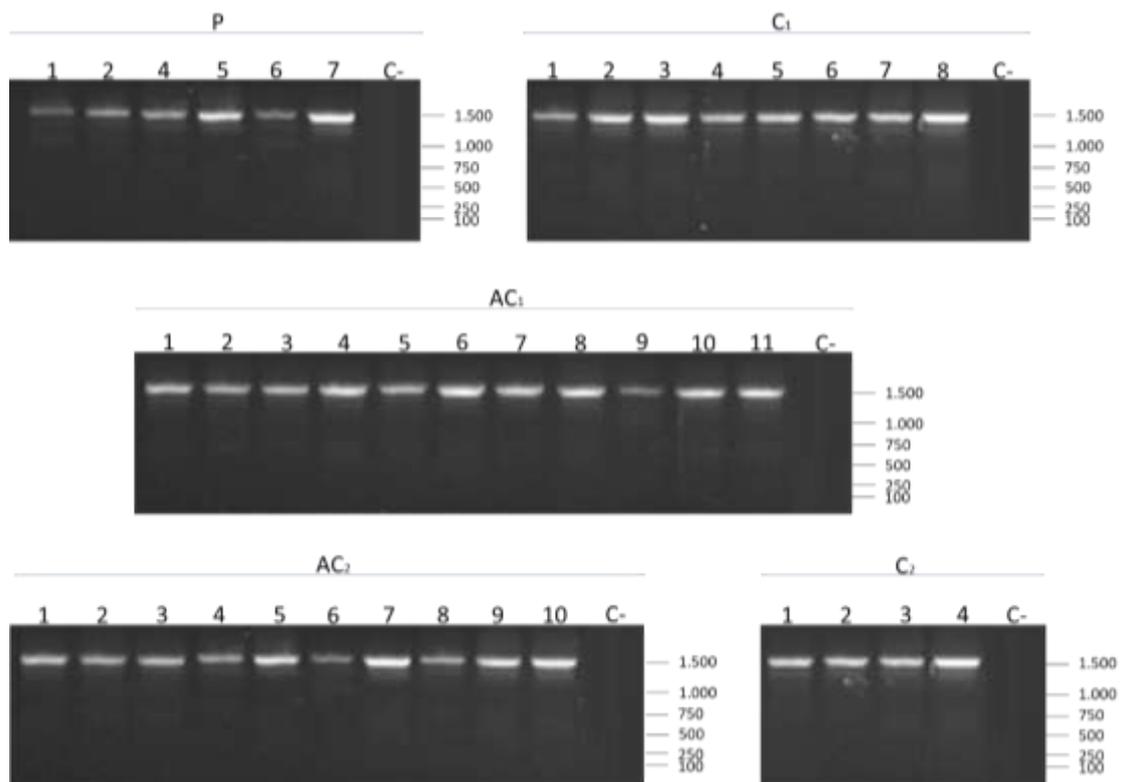


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN obtenidos tras la amplificación del gen *16S rRNA* a partir de las muestras indicadas con los cebadores 27F y 1492R. El tamaño esperado está en torno a 1.5 Kb.

Los resultados obtenidos tras la visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa permitieron confirmar la presencia de una única banda, por lo que todas las muestras fueron procesadas para su secuenciación desde ambos extremos, con los mismos cebadores utilizados previamente para su amplificación.

Obtención de secuencias consenso para el gen *16S rRNA*

Los dos electroferogramas obtenidos para cada muestra (FW y RV) fueron inspeccionados manualmente, y cada una de las secuencias fue modificada para eliminar las regiones de ambos extremos que presentaran baja calidad de identificación de bases,

así como para detectar regiones de las secuencias con baja calidad (**Fig. 5**). Para llevar a cabo esta limpieza, se consideraron como correctamente identificadas aquellas bases con una calidad mayor de 20 en la escala *Phred*, lo que supone una posibilidad de error menor del 0,1% en la asignación de bases (**Fig. 5A**).

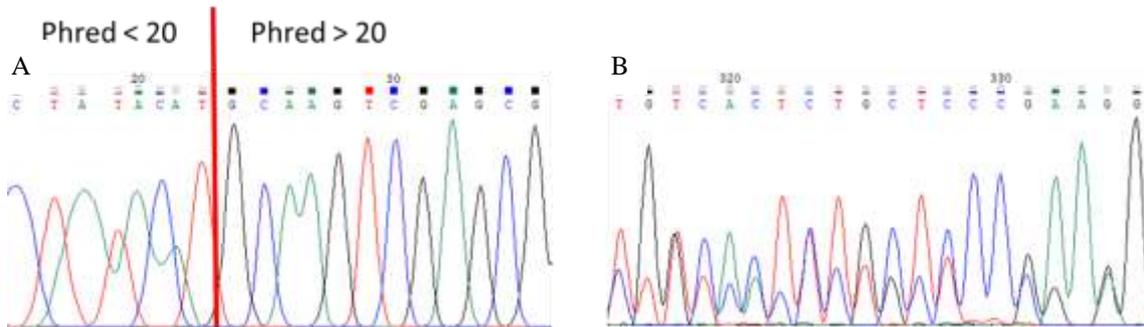


Figura 5. Ejemplo de varios electroferogramas obtenidos a partir de los productos de PCR. A) Electroferograma donde se observa uno de los extremos para la muestra C_{1.4}, con una baja calidad para la asignación de bases (*Phred* < 20), seguido de una región de alta calidad (*Phred* > 20). B) Electroferograma de una muestra descartada, debido a la presencia de un elevado ruido de fondo.

Tras inspeccionar las secuencias obtenidas, las muestras P.5, AC_{1.1}, AC_{2.8} y AC_{2.10} tuvieron que ser descartadas debido a que presentaron regiones extensas con muy baja calidad de identificación de bases (**Fig. 5B**). Esta baja calidad podría ser debida a que no se aisló completamente el microorganismo en cultivo puro, a algún tipo de contaminación durante el transporte de las muestras, o incluso a la presencia de copias del gen *16 rRNA* que presenten alguna inserción o delección en su secuencia, lo que podría generar electroferogramas con un elevado ruido de fondo (**Fig. 5B**).

Finalmente, las dos secuencias obtenidas para cada muestra fueron alineadas para obtener una secuencia consenso que abarcara la mayor cobertura posible del gen *16S rRNA*, así como una mayor fiabilidad en la identificación de las posiciones solapantes entre ambas secuencias (**Tabla 4**). De manera general, se obtuvo una secuencia consenso para 34 de los 39 aislados. En todos los casos, entre un 32,66% y un 74,03% de las posiciones fueron obtenidas a partir de dos lecturas, mientras que el resto de las posiciones, a pesar de ser el resultado de una sola lectura, presentaron como mínimo un valor *Phred* > 20. La única excepción fue el caso de la muestra C_{2.1}, donde solo se secuenció una pequeña región del gen *16S rRNA* en una dirección, aunque la muestra fue incluida para su identificación teniendo en cuenta esta limitación.

Tabla 4. Resumen de las secuencias utilizadas para la identificación molecular de los diferentes microorganismos aislados.

Filtro	Aislado	Tamaño secuencia FW ^a	Tamaño secuencia RV ^a	Secuencia consenso ^b	Solapamiento (%) ^c
P	1	1170 (266)	1147 (244)	1413	63,91%
	2	1200 (345)	1076 (221)	1421	60,17%
	4	1242 (206)	1261 (209)	1421	74,03%
	6	1083 (635)	1235 (354)	1455	59,31%
	7	1235 (321)	1117 (459)	1417	66,05%
C ₁	1	1177 (384)	1128 (496)	1420	62,32%
	2	1152 (391)	1140 (401)	1420	65,63%
	3	1167 (419)	1129 (457)	1392	63,94%
	4	1158 (428)	1138 (562)	1417	66,27%
	5	1167 (446)	1144 (448)	1416	63,2%
	6	989 (505)	1150 (418)	1421	57,57%
	7	829 (918)	1155 (447)	1417	40,72%
	8	1161 (441)	1133 (587)	1415	62,05%
C ₂	1*	393 (172)	0 (0)	393	0%
	2	1104 (520)	1124 (494)	1407	58,35%
	3	1176 (454)	1100 (492)	1401	62,46%
	4	794 (465)	1097 (389)	1427	32,66%
AC ₁	2	1112 (608)	1123 (523)	1406	58,96%
	3	1103 (486)	1129 (434)	1412	62,32%
	4	1174 (410)	1119 (606)	1422	61,25%
	5	1177 (510)	1108 (524)	1401	63,1%
	6	1128 (436)	1105 (323)	1412	58,14%
	7	1121 (492)	1146 (423)	1421	59,54%
	8	1174 (423)	1139 (538)	1419	62,93%
	9	1094 (407)	1119 (568)	1419	63%
	10	1093 (402)	1093 (484)	1404	55,55%
	11	775 (879)	1127 (516)	1374	67,47%
	AC ₂	1	1134 (457)	1111 (456)	1423
2		932 (780)	1144 (297)	1428	45,38%
3		1154 (285)	1122 (314)	1423	59,94%
4		1073 (502)	1130 (449)	1418	54,37%
5		1041 (388)	1119 (538)	1420	52,11%
6		1104 (531)	1119 (514)	1422	56,33%
7		1096 (538)	1112 (532)	1413	56,59%
9		695 (512)	1176 (260)	1408	39,98%

^a Tamaño de las secuencias, una vez eliminadas las regiones con *Phred* <20, en número de nucleótidos. Entre paréntesis, se incluye el número de bases que fueron eliminadas de la secuencia original por presentar baja calidad de identificación.

^b Tamaño de la secuencia consenso en pares de bases (bp)

^c Porcentaje de solapamiento entre las secuencias FW y RV.

* En el caso de la muestra C₂.1, solamente se ha obtenido una secuencia, basada en una pequeña región del gen *16S rRNA*.

Con la excepción del aislado C₂.1, el tamaño promedio de las secuencias consenso fue de $1415,44 \pm 12,54$ pares de bases, con un máximo de 1428 nucleótidos (muestra AC₂.2) y un mínimo de 1374 nucleótidos (muestra AC₁.11). Teniendo en cuenta que el

tamaño del gen *16S rRNA* de *E. coli* es de 1541 nucleótidos (Brosius *et al.*, 1978), los resultados mostraron una cobertura de al menos un 95% en todos los casos, por lo que se espera una correcta identificación de los aislados, como mínimo, a nivel de género.

Identificación molecular de los microorganismos aislados

La secuencia consenso obtenida para cada aislado fue utilizada para su identificación taxonómica, en el servidor EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017). Un resumen de los resultados se muestra en la **Tabla 5**. Teniendo en cuenta las restricciones utilizadas para llevar a cabo la identificación molecular (descritas en la sección de material y métodos), para 15 de los 39 aislados fue posible alcanzar el nivel de especie (38,5%), mientras que para 20 microorganismos se alcanzó el nivel de género (51,3%). Los 4 aislados restantes (10,2%) habían sido descartados previamente debido a que las secuencias obtenidas no reunían la suficiente calidad (**Fig. 5B, Tabla 3**).

Entre los 35 microorganismos que pudieron ser identificados desde el punto de vista molecular, el género más frecuente fue *Bacillus* (82,8%), aunque se observaron otros géneros minoritarios, como *Mesobacillus* (5,6%), *Cytobacillus* (2,9%), *Alkalihalobacillus* (2,9%) y *Psychrobacillus* (2,9%), todos ellos pertenecientes a la familia *Bacillaceae*. Únicamente se identificó una especie del género *Staphylococcus* (2,9%), de la familia *Staphylococcaceae*.

Dentro del género *Bacillus*, 12 aislados fueron identificados de manera inequívoca a nivel de especie (34,3%), aunque para otras 16 bacterias (45,71%), no se alcanzó homología suficiente con alguna secuencia depositada previamente en la base de datos EzBioCloud como para asignarles nivel de especie, o bien se identificaron varias especies del género con el mismo porcentaje de identidad (**Tabla 5**). En el caso del género *Psychrobacillus*, un aislado fue identificado a nivel de género, mientras que un aislado de cada uno de los géneros *Mesobacillus*, *Alkalihalobacillus* y *Staphylococcus* pudo ser identificado a nivel de especie.

Es importante destacar que para cuatro de los aislados incluidos en el estudio no fue posible obtener una identificación taxonómica ni siquiera a nivel de género, ya que presentaron menos del 98% de identidad con cualquier secuencia depositada en la base de datos. Por lo tanto, estas bacterias podrían representar nuevas especies desde un punto de vista molecular (**Tabla 5**).

Tabla 5. Resumen de los resultados de la búsqueda en la base de datos *EzBioCloud* con la identidad más probable de cada muestra.

Filtro	Aislado	Género y/o especie	Identidad (%)	Nº de diferencias	Cobertura (%)	Nº Acceso	Referencia
P	1	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	99,29	10/1413	100	KY694465	Dunlap <i>et al.</i> 2015
	2	<i>Bacillus tequilensis</i>	99,37	9/1421	100	AYTO01000043	Gatson <i>et al.</i> 2006
		<i>Bacillus cabrialesii</i>	99,37	9/1421	100	MK462260	De Los Santos Villalobos <i>et al.</i> 2019
		<i>Bacillus inaquosorum</i>	99,37	9/1421	100	AMXN01000021	Rooney <i>et al.</i> 2009; Dunlap <i>et al.</i> 2020
	4	<i>Bacillus wiedmannii</i>	99,72	4/1430	100	LOBC01000053	Miller <i>et al.</i> 2016
		<i>Bacillus albus</i>	99,72	4/1430	100	MAOE01000087	Liu <i>et al.</i> 2017
		<i>Bacillus luti</i>	99,72	4/1430	100	MACI01000041	Liu <i>et al.</i> 2017
6	<i>Cytobacillus horneckiae</i> *	98,52	21/1420	100	FR749913	Vaishampayan <i>et al.</i> 2010; Patel and Gupta 2020	
7	<i>Bacillus safensis</i>	99,79	3/1416	100	ASJD01000027	Abril <i>et al.</i> 2019	
C1	1	<i>Bacillus halotolerans</i>	99,72	4/1420	100	LPVF01000003	Delaporte & Sasson 1967; Tindall 2017
		<i>Bacillus stercoris</i>	99,72	4/1420	100	MN536904	Adelskov & Patel 2017; Dunlap <i>et al.</i> 2020
	2	<i>Bacillus subtilis</i>	99,65	5/1420	100	ABQL01000001	Ehrenberg 1835; Cohn 1872
	3	<i>Bacillus halotolerans</i>	99,93	1/1392	100	LPVF01000003	Delaporte & Sasson 1967; Tindall 2017
		<i>Bacillus stercoris</i>	99,93	1/1392	100	MN536904	Adelskov & Patel 2017; Dunlap <i>et al.</i> 2020
	4	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,79	3/1416	100	AE017333	Weigmann 1898; Chester 1901
	5	<i>Bacillus infantis</i>	99,58	6/1416	100	CP006643	Ko <i>et al.</i> 2006
	6	<i>Bacillus paranthracis</i>	99,93	1/1421	100	MACE01000012	Liu <i>et al.</i> 2017
<i>Bacillus nitratireducens</i>		99,93	1/1421	100	KJ812430	Liu <i>et al.</i> 2017	
7	<i>Mesobacillus boroniphilus</i> *	98,23	25/1409	100	BAUW01000204	Ahmed <i>et al.</i> 2007; Patel & Gupta 2020	
	<i>Mesobacillus jeotgali</i> *	98,23	25/1409	100	AF221061	Yoon <i>et al.</i> 2001; Patel & Gupta 2020	
8	<i>Bacillus infantis</i>	99,43	8/1415	100	CP006643	Ko <i>et al.</i> 2006	
C2	1	<i>Bacillus pumilus</i>	100	0/392	100	ABRX01000007	Meyer & Gottheil 1901
		<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	100	0/392	100	JOTP01000061	Liu <i>et al.</i> 2016
		<i>Bacillus safensis</i>	100	0/392	100	ASJD01000027	Abril <i>et al.</i> 2019
		<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i>	100	0/392	99,93	KY990920	Abril <i>et al.</i> 2019
	2	<i>Bacillus albus</i>	99,79	3/1406	100	MAOE01000087	Liu <i>et al.</i> 2017
		<i>Bacillus luti</i>	99,79	3/1406	100	MACI01000041	Liu <i>et al.</i> 2017
	3	<i>Bacillus velezensis</i>	100	0/1382	95,38	AY603658	Ruiz-García <i>et al.</i> 2005
4	<i>Bacillus flexus</i>	99,79	3/1417	100	BCVD01000224	Batchelor 1919; Priest <i>et al.</i> 1989	

AC1	2	<i>Bacillus tequilensis</i>	99,93	1/1406	100	AYTO01000043	Gatson <i>et al.</i> 2006
		<i>Bacillus cabrialesii</i>	99,93	1/1406	100	MK462260	De Los Santos Villalobos <i>et al.</i> 2019
		<i>Bacillus inaquosorum</i>	99,93	1/1406	100	AMXN01000021	Rooney <i>et al.</i> 2009; Dunlap <i>et al.</i> 2020
	3	<i>Bacillus tequilensis</i>	99,93	1/1411	100	AYTO01000043	Gatson <i>et al.</i> 2006
		<i>Bacillus cabrialesii</i>	99,93	1/1411	100	MK462260	De Los Santos Villalobos <i>et al.</i> 2019
		<i>Bacillus inaquosorum</i>	99,93	1/1411	100	AMXN01000021	Rooney <i>et al.</i> 2009; Dunlap <i>et al.</i> 2020
	4	<i>Bacillus tequilensis</i>	99,93	1/1422	100	AYTO01000043	Gatson <i>et al.</i> 2006
		<i>Bacillus cabrialesii</i>	99,93	1/1422	100	MK462260	De Los Santos Villalobos <i>et al.</i> 2019
		<i>Bacillus inaquosorum</i>	99,93	1/1422	100	AMXN01000021	(Rooney <i>et al.</i> 2009) Dunlap <i>et al.</i> 2020
	5	<i>Bacillus paramycoides</i>	99,57	6/1401	100	MAOI01000012	Liu <i>et al.</i> 2017
		<i>Bacillus paranthracis</i>	99,57	6/1401	100	MACE01000012	Liu <i>et al.</i> 2017
		<i>Bacillus nitratireducens</i>	99,57	6/1401	100	KJ812430	Liu <i>et al.</i> 2017
	6	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	99,72	4/1412	100	AM747813	Delaporte & Sasson 1967; Liu <i>et al.</i> 2020
	7	<i>Psychrobacillus</i> sp.	100	0/1420	100	LJIY01000004	Liu <i>et al.</i> 2015
8	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	99,79	3/1418	100	ASJD01000027	Abril <i>et al.</i> 2019	
	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i>	99,79	3/1418	99,93	KY990920	Abril <i>et al.</i> 2019	
9	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	99,79	3/1419	100	ASJD01000027	Abril <i>et al.</i> 2019	
	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i>	99,79	3/1419	99,93	KY990920	Abril <i>et al.</i> 2019	
10	<i>Bacillus xiamenensis</i>	100	0/1404	100	AMSH01000114	Lai <i>et al.</i> 2014	
11	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99,71	4/1374	100	MRZO01000018	Schleifer & Kloos 1975	
AC2	1	<i>Bacillus megaterium</i>	99,72	4/1423	100	JJMH01000057	De Bary 1884
	2	<i>Bacillus paralicheniformis</i> *	98,73	18/1420	100	KY694465	Dunlap <i>et al.</i> 2015
	3	<i>Bacillus siamensis</i>	99,93	1/1422	100	AJVF01000043	Sumpavapol <i>et al.</i> 2010
		<i>Bacillus velezensis</i>	99,93	1/1382	95,38	AY603658	Ruiz-García <i>et al.</i> 2005
	4	<i>Bacillus flexus</i>	99,79	3/1417	100	BCVD01000224	Batchelor 1919; Priest <i>et al.</i> 1989
	5	<i>Bacillus tequilensis</i>	99,72	4/1420	100	AYTO01000043	Gatson <i>et al.</i> 2006
		<i>Bacillus cabrialesii</i>	99,72	4/1420	100	MK462260	De Los Santos Villalobos <i>et al.</i> 2019
		<i>Bacillus inaquosorum</i>	99,72	4/1420	100	AMXN01000021	Rooney <i>et al.</i> 2009; Dunlap <i>et al.</i> 2020
	6	<i>Bacillus paramycoides</i>	99,72	4/1422	100	MAOI01000012	Liu <i>et al.</i> 2017
		<i>Bacillus paranthracis</i>	99,72	4/1422	100	MACE01000012	Liu <i>et al.</i> 2017
		<i>Bacillus nitratireducens</i>	99,72	4/1422	100	KJ812430	Liu <i>et al.</i> 2017
7	<i>Mesobacillus foraminis</i>	99,72	4/1413	100	AJ717382	Tiago <i>et al.</i> 2006; Patel & Gupta 2020	
9	<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	99,22	11/1405	100	CP019985	Nielsen <i>et al.</i> 1995; Patel & Gupta 2020	

* Aislados que podrían ser consideradas como nuevas especies a nivel molecular, puesto que no hay disponible ninguna secuencia con más de un 99% de identidad.

Finalmente, se llevó a cabo una comparación, tanto a nivel de género como a nivel de especie, de los microorganismos aislados en función de las diferentes condiciones atmosféricas. En la **Tabla 6** se observa cómo el género *Bacillus* estaba presente en todas las condiciones ambientales. Por otra parte, el género *Mesobacillus* estaba presente en condiciones de presencia y ausencia de calima, mientras el resto de géneros solo estuvo presente en una de ellas. Estos resultados sugieren que los géneros *Psychrobacillus*, *Staphylococcus* y *Alkalihalobacillus* estarían presentes en la atmósfera en ausencia de calima, y que sus nichos podrían ser ocupados por especies del género *Bacillus* y *Mesobacillus* en condiciones de tormentas de polvo (**Tabla 6**). Hay que destacar el hecho de que el género *Cytobacillus* solo fue identificado en el periodo posterior a un evento de calima, por lo que podría suponer una presencia transitoria hasta alcanzar de nuevo las condiciones de estabilidad ambiental.

Tabla 6. Diversidad a nivel de género en función de las condiciones ambientales.

Género	P	C	AC
<i>Alkalihalobacillus</i>			
<i>Bacillus</i>			
<i>Cytobacillus</i>			
<i>Mesobacillus</i>			
<i>Psychrobacillus</i>			
<i>Staphylococcus</i>			

Las celdas en color verde indican la presencia del género en el filtro, mientras que las celdas en color rojo representan la ausencia del género. **P** (Posterior a calima), **C** (Presencia de calima), **AC** (Ausencia de calima).

Por otra parte, el análisis a nivel de especie, incluyendo aquellos aislados que pudieron ser identificados inequívocamente (**Tabla 5**), mostró que la diversidad de microorganismos es mayor en condiciones de ausencia de calima (9 especies distintas) que en condiciones de calima (4 especies). Nuevamente, la menor diversidad fue observada durante las condiciones climáticas de transición, después de un evento de calima (2 especies) (**Tabla 7**).

Los resultados indican que *A. clausii*, *B. frigiditolerans*, *B. megaterium*, *B. xiamenensis*, *M. foraminis* y *S. xylosus* parecen estar representadas únicamente en condiciones climáticas normales, mientras que se han identificado tres especies de *Bacillus* aisladas únicamente bajo condiciones de presencia de calima (*B. infantis*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*). Finalmente, *B. paralicheniformis* y *B. safensis* parecen aparecer en la atmósfera justo después de las tormentas de arena, como especies de

transición que se mantendrían formando parte de la atmósfera en condiciones de estabilidad.

Tabla 7. Diversidad a nivel de especies en función de las condiciones ambientales

Especies	P	C₁+C₂	AC₁+AC₂
<i>A. clausii</i>			
<i>B. flexus</i>			
<i>B. frigoritolerans</i>			
<i>B. infantis</i>			
<i>B. licheniformis</i>			
<i>B. megaterium</i>			
<i>B. paralicheniformis</i>			
<i>B. safensis</i>			
<i>B. subtilis</i>			
<i>B. xiamenensis</i>			
<i>M. foraminis</i>			
<i>S. xylosus</i>			

Las celdas en color verde indican la presencia del género en el filtro, mientras que las celdas en color rojo representan la ausencia del género. **P** (Posterior a calima), **C** (Presencia de calima), **AC** (Ausencia de calima).

Discusión

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo un análisis de la presencia de bacterias en muestras de aire tomadas bajo diferentes condiciones climáticas, incluyendo muestras obtenidas durante periodos con presencia de calima y en condiciones ambientales normales. A partir de los filtros seleccionados (**Tabla 1**), se llevó a cabo el cultivo de los microorganismos que se encontraban retenidos en los mismos (**Fig. 1**). Una vez aisladas las colonias, se llevó a cabo una primera identificación haciendo uso del microscopio óptico, para confirmar que se trataba de bacterias, así como para realizar una visualización morfológica inicial (**Fig. 3**).

Es necesario destacar que, durante la toma de muestras, la ubicación del muestreador (Facultad de Enfermería y Fisioterapia de la ULL), hizo que los filtros estuvieran expuestos a contaminantes químicos de origen urbano (eminentemente contaminación por vehículos). Esto podría haber afectado a la viabilidad de algunos microorganismos, por lo que el número de aislados, así como su diversidad pudo verse influenciada por esta variable. En futuros estudios, esta limitación podría ser superada, simplemente modificando el punto de muestreo.

Otra limitación importante fue la imposibilidad de llevar a cabo una completa identificación morfológica en el laboratorio, por lo que fue necesario utilizar métodos moleculares para la identificación, mediante la amplificación y secuenciación del gen *16S rRNA* (**Fig. 5, Tabla 4**). El análisis espectrofotométrico de las preparaciones de ADN reveló la presencia de ciertos contaminantes, como polisacáridos y proteínas, que podrían actuar como inhibidores de la PCR (**Fig. 4**), aunque los resultados de la amplificación fueron satisfactorios en todos los casos. Las secuencias obtenidas permitieron la identificación de 35 de 39 aislados (89,74%), de los cuales, 15 (42,86%) a nivel de especie y 20 (57,14%) a nivel de género.

Entre las especies más relevantes identificadas en este trabajo, cabe mencionar *B. subtilis*, *B. safensis* y *S. xylosus*. *B. subtilis* es una bacteria Gram-positiva aerobia no patógena, pero que puede contaminar algunos alimentos, aunque no suele causar intoxicación alimentaria (Madigan *et al.*, 2006). Tradicionalmente, para esta especie se habían descrito cuatro subespecies, aunque recientemente han sido reposicionadas a nivel de especie. Precisamente, una de ellas ha sido identificada en este trabajo (*B. stercoris*)

(Dunlap *et al.*, 2020). Por otra parte, *B. safensis* es una bacteria Gram-positiva aerobia, aislada por primera vez a partir de la superficie de vehículos espaciales, y que crece un 60% más en ambientes de microgravedad, como en la estación espacial internacional (Coil *et al.*, 2016). Esta capacidad de resistencia podría explicar la presencia de esta bacteria en la atmósfera durante largos periodos de tiempo, lo que permitiría su dispersión mediante las tormentas de polvo sahariano. Finalmente, *S. xylosus* es una bacteria Gram-positiva aerobia, comensal en la piel de humanos y animales, aunque también está presente en el medio ambiente y puede llegar a causar pielonefritis en humanos (Esper *et al.*, 2000).

Es importante destacar que, durante el presente estudio, se identificaron varias bacterias cuya secuencia no ha sido depositada previamente en el servidor EzBioCloud (y tampoco en la base de datos NCBI), por lo que podrían suponer nuevos aislados desde un punto de vista molecular. Estos aislados han sido debidamente almacenados, lo que permitirá llevar a cabo un estudio pormenorizado en el futuro, tanto a nivel bioquímico como molecular.

En este estudio, el 100% de las bacterias identificadas pertenecen al filo *Firmicutes*. Sin embargo, varios estudios afirman que el filo *Firmicutes* suele estar muy poco representado, con apenas un 10% (González-Toril *et al.*, 2020), pero pudiendo alcanzar un 29%, por detrás del filo *Proteobacteria* (Sanchez De La Campa *et al.*, 2013; Stern *et al.*, 2021). En otros estudios, se ha observado que el filo más abundante es *Actinobacteria*, seguido por *Proteobacteria* y luego por *Firmicutes* (Gat *et al.*, 2017), aunque también se ha demostrado que durante los eventos de calima suelen introducirse en la atmósfera de Canarias taxones de bacterias que no estaban presentes previamente (Mazar *et al.*, 2016). Las diferencias entre los resultados obtenidos en este trabajo y otros estudios podrían deberse a las limitaciones identificadas previamente.

Cabe mencionar que una parte de los filtros empleados en este trabajo ha sido utilizada para la extracción de ADN genómico, y estas muestras han sido enviadas para el análisis del microbioma mediante secuenciación de nueva generación. De esta manera, los resultados de ambos trabajos permitirán obtener una descripción mucho más completa de la comunidad bacteriana presente en las diferentes condiciones climáticas, así como contrastar los resultados del presente estudio. En general, la metodología empleada en este trabajo ha permitido alcanzar tres de los cuatro objetivos propuestos, y el cuarto

objetivo ha sido abordado parcialmente. En el futuro, se plantea continuar con el análisis bioquímico y molecular de aquellos aislados que podrían representar nuevas especies desde el punto de vista molecular, así como complementar este estudio utilizando los datos obtenidos del análisis mediante secuenciación masiva, lo que nos permitirá obtener una estimación de los organismos totales presentes en las muestras, incluyendo tanto microorganismos viables como otros no viables.

Conclusiones

1. El conjunto de técnicas utilizadas en el presente trabajo son útiles para llevar a cabo el aislamiento y la identificación de bacterias aéreas a nivel de género, e incluso a nivel de especie.
2. Se han aislado veintiocho bacterias del género *Bacillus*, dos bacterias del género *Mesobacillus* y una de los géneros *Alkalihalobacillus*, *Brevibacterium*, *Cytobacillus* y *Staphylococcus*.
3. Se han aislado nuevas especies desde el punto de vista molecular, pertenecientes a los géneros *Cytobacillus*, *Mesobacillus* y *Bacillus*, aunque es necesario continuar con su estudio en profundidad.
4. Se han detectado diferencias en la composición bacteriana presente en la atmosfera en condiciones de calima y de ausencia de calima, aunque es necesario confirmar y ampliar estos resultados en estudios posteriores.

Conclusions

1. Techniques used are useful to carry out isolation and identification of bacteria up to genera level, and even to the species level.
2. Twenty-eight bacteria from the *Bacillus* genus, two from *Mesobacillus*, and one from *Alkalihalobacillus*, *Brevibacterium*, *Cytobacillus* and *Staphylococcus* have been isolated.
3. New species, from a molecular point of view, which belong to *Cytobacillus*, *Mesobacillus* and *Bacillus* have been found.
4. Some differences about bacteria composition have been detected between dust storm and non-dust storm conditions, however, these results should be confirmed in the future.

Bibliografía

- Abril, A. G., Rama, J. L. R., Feijoo-Siota, L., Calo-Mata, P., Salazar, S., Peix, A., Velázquez, E., & Villa, T. G. (2019). *Bacillus safensis* subsp. *Osmophilus* subsp. Nov., isolated from condensed milk, and description of *Bacillus safensis* subsp. *Safensis* subsp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(1), 189-195. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003126>
- Adelskov, J., & Patel, B. K. C. (2016). A molecular phylogenetic framework for *Bacillus subtilis* using genome sequences and its application to *Bacillus subtilis* subspecies *stecoris* strain D7XPN1, an isolate from a commercial food-waste degrading bioreactor. *3 Biotech*, 6(1), 96. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0408-8>
- Ahmed, I., Yokota, A., & Fujiwara, T. (2007). A novel highly boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. Nov., isolated from soil, that requires boron for its growth. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 11(2), 217-224. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0027-0>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bowers, R. M., McLetchie, S., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of potential source environments. *The ISME journal*, 5(4), 601-612. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.167>
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J., & Noller, H. F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10), 4801-4805. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.4801>
- Burrows, S. M., Elbert, W., & Lawrence, M. G. (2009). Bacteria in the global atmosphere – Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, 9, 10777-10827.
- Coil, D. A., Neches, R. Y., Lang, J. M., Brown, W. E., Severance, M., Cavalier, D., & Eisen, J. A. (2016). Growth of 48 built environment bacterial isolates on board the International Space Station (ISS). *PeerJ*, 4, e1842. <https://doi.org/10.7717/peerj.1842>
- De Longueville, F., Hountondji, Y.-C., Henry, S., & Ozer, P. (2010). What do we know about effects of desert dust on air quality and human health in West Africa compared to other regions? *The Science of the total environment*, 409(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.025>
- Delort, A.-M., Väitilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Parazols, M., Mailhot, G., Laj, P., & Deguillaume, L. (2010). A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. *Atmospheric Research*, 98(2), 249-260. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2010.07.004>
- Dominguez-Rodriguez, A., Baez-Ferrer, N., Rodríguez, S., Avanzas, P., Abreu-Gonzalez, P., Terradellas, E., Cuevas, E., Basart, S., & Werner, E. (2020). Saharan Dust Events in the Dust Belt -Canary Islands- and the Observed Association with in-Hospital Mortality of Patients with Heart Failure. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 376. <https://doi.org/10.3390/jcm9020376>
- Dorta, P. (2001). Aproximación a la influencia de las advecciones de aire sahariano en la propagación de los incendios forestales en la provincia de Santa Cruz de Tenerife. *Actas del XVII del Congreso de Geógrafos Españoles*, 158-162.
- Dorta, P., Cardona, P., Collado, C., & Mendoza, S. (2005). Frecuencia, estacionalidad y tendencias de las advecciones de aire sahariano en Canarias (1976-2003). *Investigaciones Geográficas*, 38, 23-45.
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Zeigler, D. R. (2020). Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *Stercoris* to species status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01354-9>
- Engelstaedter, S., Tegen, I., & Washington, R. (2006). North African dust emissions and transport. *Earth-Science Reviews*, 79(1-2), 73-100. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2006.06.004>
- Esper, R. C., Morales, M. de los Á. T., & Ruiz, S. S. (2000). *Staphylococcus xylosus*: Una bacteria emergente. *Revista Médica del Hospital General de México*, 63(2), 107-111.

- Fröhlich-Nowoisky, J., Burrows, S. M., Xie, Z., Engling, G., Solomon, P. A., Fraser, M. P., Mayol-Bracero, O. L., Artaxo, P., Begerow, D., Conrad, R., Andreae, M. O., Després, V. R., & Pöschl, U. (2012). Biogeography in the air: Fungal diversity over land and oceans. *Biogeosciences*, 9(3), 1125-1136. <https://doi.org/10.5194/bg-9-1125-2012>
- Gat, D., Mazar, Y., Cytryn, E., & Rudich, Y. (2017). Origin-Dependent Variations in the Atmospheric Microbiome Community in Eastern Mediterranean Dust Storms. *Environmental Science & Technology*, 51(12), 6709-6718. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00362>
- Gonzalez-Martin, C., Coronado-Alvarez, N. M., Teigell-Perez, N., Diaz-Solano, R., Exposito, F. J., Diaz, J. P., Griffin, D. W., & Valladares, B. (2018). Analysis of the Impact of African Dust Storms on the Presence of Enteric Viruses in the Atmosphere in Tenerife, Spain. *Aerosol and Air Quality Research*, 18(7), 1863-1873. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2017.11.0463>
- Gonzalez-Martin, C., Perez-Gonzalez, C., Gonzales-Toril, E., Exposito, F.C., Griffin, D.W., Aguilera-Bazan, A., Diaz, J.P. (2021). Airborne bacterial metagenomic characterization according to their origin in Tenerife, Canary Islands. In press.
- Gorbushina, A. A., Kort, R., Schulte, A., Lazarus, D., Schnetger, B., Brumsack, H.-J., Broughton, W. J., & Favet, J. (2007). Life in Darwin's dust: Intercontinental transport and survival of microbes in the nineteenth century. *Environmental microbiology*, 9(12), 2911-2922. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01461.x>
- Goudie, A S, & Middleton, N. J. (2001). Saharan dust storms: Nature and consequences. *Earth-Science Reviews*, 56(1-4), 179-204. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(01\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(01)00067-8)
- Goudie, Andrew S. (2009). Dust storms: Recent developments. *Journal of Environmental Management*, 90(1), 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.07.007>
- Gregory, P. H. (1961). The microbiology of the atmosphere. *The Microbiology of the Atmosphere*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19642200754>
- Griffin, D. W. (2004). Terrestrial microorganisms at an altitude of 20,000 m in Earth ' s atmosphere. *Aerobiologia*, 20, 135-140.
- Herman, J. R., Krotkov, N., Celarier, E., Larko, D., & Labow, G. (1999). Distribution of UV radiation at the Earth's surface from TOMS-measured UV-backscattered radiances. *Journal of Geophysical Research*, 104(D10), 12059-12076. <https://doi.org/10.1029/1999JD900062>
- Huneeus, N., Schulz, M., Balkanski, Y., Griesfeller, J., Prospero, J. M., Kinne, S., Bauer, S., Boucher, O., Chin, M., Dentener, F., Diehl, T., Easter, R., Fillmore, D., Ghan, S., Ginoux, P., Grini, A., Horowitz, L., Koch, D., Krol, M. C., ... Zender, C. S. (2011). Global dust model intercomparison in AeroCom phase I. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 11(15), 7781-7816. <https://doi.org/10.5194/acp-11-7781-2011>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jones, A. M., & Harrison, R. M. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—a review. *The Science of the total environment*, 326(1-3), 151-180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.11.021>
- Kanagawa, T. (2003). Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4), 317-323. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90130-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90130-7)
- Kellogg, C. A., & Griffin, D. W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in ecology & evolution*, 21(11), 638-644. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.07.004>
- Knutsen, A. P., Bush, R. K., Demain, J. G., Denning, D. W., Dixit, A., Fairs, A., Greenberger, P. A., Kariuki, B., Kita, H., Kurup, V. P., Moss, R. B., Niven, R. M., Pashley, C. H., Slavin, R. G., Vijay, H. M., & Wardlaw, A. J. (2012). Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(2), 280-291. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.970>
- López, E. M., Bulto, P. O., González, A. O., & Valencia, A. R. (2006). Tormentas de Polvo del Sahara. Su impacto en el Atlántico, Mar Caribe y el Golfo de México. *Revista Cubana de Meteorología*, 13(1), Article 1. <http://rcm.insmet.cu/index.php/rcm/article/view/287>

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Brock, T. D. (2006). *Brock biology of microorganisms* (11. ed., internat. ed). Pearson, Prentice Hall.
- Mazar, Y., Cytryn, E., Erel, Y., & Rudich, Y. (2016). Effect of Dust Storms on the Atmospheric Microbiome in the Eastern Mediterranean. *Environmental Science & Technology*, *50*(8), 4194-4202. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06348>
- Meier, F. C., & Lindbergh, C. A. (1935). Collecting microorganisms from the arctic atmosphere. *Science*, *40*, 5-20.
- Miquel, P., Cambert, R. (1901): *Traité de bacteriologie pure et appliqueé*. Ed. Masson et Cia. Paris
- Miquel, M. P., Moreau (1884): «Des organismes microscopiques de l'air de la mer». *Semaine Médicale*, 6 mars.
- Palmgren, F., Berkowicz, R., Ziv, A., & Hertel, O. (1999). Actual car fleet emissions estimated from urban air quality measurements and street pollution models. *Science of The Total Environment*, *235*(1), 101-109. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00196-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00196-5)
- Pearce, D. A., Bridge, P. D., Hughes, K. A., Sattler, B., Psenner, R., & Russell, N. J. (2009). Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, *69*(2), 143-157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00706.x>
- Pérez, N., Salvador, P., Reche, C., Querol, X., & de la Rosa, J. (2019). *Encargo del Ministerio para la Transición Ecológica a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas para la detección de episodios naturales de aportes transfronterizos de partículas y otras fuentes de contaminación de material particulado*.
- Prospero, J. M., Blades, E., Mathison, G., & Naidu, R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, *21*(1), 1-19. <https://doi.org/10.1007/s10453-004-5872-7>
- Prospero, J. M., Ginoux, P., Torres, O., Nicholson, S. E., & Gill, T. E. (2002). Environmental Characterization of Global Sources of Atmospheric Soil Dust Identified with the Nimbus 7 Total Ozone Mapping Spectrometer (toms) Absorbing Aerosol Product. *Reviews of Geophysics*, *40*(1), 2-1-2-31. <https://doi.org/10.1029/2000RG000095>
- Querol, X., Pey, J., Pandolfi, M., Alastuey, A., Cusack, M., Pérez, N., Moreno, T., Viana, M., Mihalopoulos, N., Kallos, G., & Kleanthous, S. (2009). African dust contributions to mean ambient PM10 mass-levels across the Mediterranean Basin. *Atmospheric Environment*, *43*(28), 4266-4277. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.06.013>
- Sanchez De La Campa, A., Garcia-Salamanca, A., Solano, J., de la Rosa, J. J., Ramos, J.-L. L., Sánchez de la Campa, A., García-Salamanca, A., Solano, J., de la Rosa, J. J., & Ramos, J.-L. L. (2013). Chemical and microbiological characterization of atmospheric particulate matter during an intense african dust event in Southern Spain. *Environmental science & technology*, *47*(8), 3630-3638. <https://doi.org/10.1021/es3051235>
- Sánchez-Lerma, B., Morales-Chirivella, F. J., Peñuelas, I., Blanco Guerra, C., Mesa Lugo, F., Aguinaga-Ontoso, I., & Guillén-Grima, F. (2009). High prevalence of asthma and allergic diseases in children aged 6 to [corrected] 7 years from the Canary Islands. [Corrected]. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, *19*(5), 383-390.
- Schlaberg, R., Simmon, K. E., & Fisher, M. A. (2012). A Systematic Approach for Discovering Novel, Clinically Relevant Bacteria. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(3), 422-430. <https://doi.org/10.3201/eid1803.111481>
- Schwanghart, W., & Schütt, B. (2008). Meteorological causes of Harmattan dust in West Africa. *Geomorphology*, *95*(3), 412-428. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2007.07.002>
- Seifried, J. S., Wichels, A., & Gerds, G. (2015). Spatial distribution of marine airborne bacterial communities. *MicrobiologyOpen*, *25*, 1-16. <https://doi.org/10.1002/mbo3.253>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*(1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>

- Smith, D. J., Griffin, D. W., & Schuerger, A. C. (2010). Stratospheric microbiology at 20 km over the Pacific Ocean. *Aerobiologia*, 26(1), 35-46. <https://doi.org/10.1007/s10453-009-9141-7>
- Stern, R. A., Mahmoudi, N., Buckee, C. O., Schartup, A. T., Koutrakis, P., Ferguson, S. T., Wolfson, J. M., Wofsy, S. C., Daube, B. C., & Sunderland, E. M. (2021). The Microbiome of Size-Fractionated Airborne Particles from the Sahara Region. *Environmental Science & Technology*, 55(3), 1487-1496. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06332>
- Teigell-Pérez, N. (2015). Influencia de las intrusiones de polvo sahariano sobre las comunidades bacterianas y fúngicas aerotransportadas en la ciudad de san cristóbal de la laguna, tenerife. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna.
- Tegen, I., Schepanski, K., & Heinold, B. (2012). Comparing two years of Saharan dust source activation obtained by regional modeling and satellite observations. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, 12(10), 27667-27691. <https://doi.org/10.5194/acpd-12-27667-2012>
- Woo, P. C. Y., Teng, J. L. L., Wu, J. K. L., Leung, F. P. S., Tse, H., Fung, A. M. Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K.-Y. (2009). Guidelines for interpretation of 16S rRNA gene sequence-based results for identification of medically important aerobic Gram-positive bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 8), 1030-1036. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.008615-0>
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>