

Análisis por técnicas morfológicas y secuenciación de ADN del polen atmosférico de la Comunidad de Madrid: estudios preliminares

Morphological analysis and DNA sequencing of atmospheric pollen in Madrid region: preliminary study

Análise por técnicas morfológicas e sequenciação de ADN do pólen atmosférico da Comunidade de Madrid: estudos preliminares

Adela Montserrat Gutiérrez-Bustillo¹, Zuzana Ferencova¹, Andrés Núñez², Antonio Alcamí³, Pascual Campoy⁴, Raúl Guantes⁵, Diego A. Moreno²

¹Departamento de Biología Vegetal II, Universidad Complutense de Madrid (UCM).

²Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Universidad Politécnica de Madrid (ETSII-UPM).

³Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM).

⁴Computer Vision Group, Centre for Automation and Robotics (CSIC-UPM).

⁵Department of Condensed Matter Physics, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Cita: Gutiérrez AM, Ferencova Z, Núñez A, et ál. Análisis por técnicas morfológicas y secuenciación de ADN del polen atmosférico de la Comunidad de Madrid: estudios preliminares. Rev. salud ambient. 2016;16(1):71-7.

Recibido: 14 de mayo de 2016. **Aceptado:** 6 de junio de 2016. **Publicado:** 15 de junio de 2016.

Autor para correspondencia: Adela Montserrat Gutiérrez-Bustillo.

Correo e: amgutierrez@farm.ucm.es

Departamento de Biología Vegetal II, Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Avda. de Ramón y Cajal s/n 28040 Madrid

Financiación: Programa de Tecnologías 2013 de la Comunidad de Madrid (S2013/MAE-2874).

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

Declaraciones de autoría: Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

Premio a la mejor comunicación oral otorgado por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos en el XIII Congreso Español de Salud Ambiental y la IX Conferencia Nacional de Disruptores Endocrinos, con el título "Estudio integral de la "aerobiota" en la Comunidad de Madrid (Programa AIRBIOTA-CM)"

Resumen

Hasta el momento, el estudio de las partículas biológicas en el aire que respiramos, se ha dirigido, principalmente, al conocimiento y control del polen y esporas, aeroalérgenos cuyo impacto en salud es bien conocido. Recientemente la comunidad científica ha sugerido que el aire es un ecosistema en sí mismo, que tendría su propia "aerobiota", compuesta principalmente por virus, bacterias, esporas de hongos y polen. Para estudiar en conjunto toda esta biodiversidad en el aire urbano en la Comunidad de Madrid, surge el consorcio pluridisciplinar AIRBIOTA-CM, que integra a cinco grupos de investigación de áreas muy diferentes, que pretenden obtener una visión conjunta sobre la composición y dinámica de las partículas biológicas del aire, optimizando los sistemas de muestreo y análisis. Las propuestas más novedosas de las investigaciones iniciadas por este consorcio, son la utilización de técnicas innovadoras de genética molecular como la secuenciación masiva aplicada en metagenómica ("Next Generation Sequencing", NGS) y el uso de nuevas estrategias de captación, como el empleo de aeronaves no tripuladas, para muestrear a diferentes alturas y en localizaciones geográficas urbanas que *a priori* puedan tener una composición diferente de la biota y tengan una actividad humana relevante.

El proyecto se inicia en otoño de 2014, y los resultados preliminares que presentamos son los obtenidos mediante el análisis morfológico tradicional y el análisis del ADN del polen de una misma muestra procedente de un captador Burkard. Estos resultados evidencian que los captadores tipo Hirst utilizados por las redes aerobiológicas pueden emplearse también en los estudios de metagenómica, y que los datos obtenidos mediante la aplicación de ambos métodos de análisis coinciden a grandes rasgos, lo que revela que esta nueva metodología constituye una buena aproximación y posible alternativa al análisis morfológico, aunque se necesitan más estudios comparativos para adaptar bien esta tecnología.

Palabras clave: aerobiología; metagenómica; polen; Madrid.

Abstract

So far, the study of the biological particles in the air we breathe has been mainly directed at knowing and controlling pollen and spores, aeroallergens with a well-known health impact., It has been recently suggested that the air is an ecosystem in itself, and that it probably has its own biota, which would be composed mainly of viruses, bacteria, fungal spores, and pollen. The main objective of the AIRBIOTA-CM project is to study this diverse set of biological particles present in the urban air in the Community of Madrid using a multidisciplinary, innovative and integrative approach.

The project is collaboration between five research groups in very different fields, which aim is to get an overview on the composition and dynamics of biological particles in the air to optimize the methods of sampling and analysis.

As a methodological innovation, there is an attempt to apply the breakthroughs in metagenomics to the study of bioaerosols. In addition, new collection strategies have been used, such as the use of unmanned aerial vehicles by designing or adapting new samplers for these vehicles, to sample at different altitudes and in urban geographic locations that might presumably have a different composition of the biota and relevant human activity.

The project started in autumn 2014. The preliminary results presented here refer to the comparison of results obtained by means of traditional (light microscopy) and metagenomics methods on atmospheric pollen in the Community of Madrid.

The data obtained by both analyses coincide broadly, revealing that the molecular methodology is a good and possible alternative approach to morphological analysis, although more comparative studies to adapt well this technology are needed.

Keywords: aerobiology; metagenomics; pollen; Madrid.

Resumo

Até ao momento o estudo das partículas biológicas no ar que respiramos tem sido principalmente dirigido ao conhecimento e controlo de pólen e esporos, alergénicos cujo impacto na saúde é bem conhecido. Recentemente a comunidade científica tem sugerido que o ar é só por si um ecossistema, que tem a sua própria "aerobiota" composta principalmente por vírus, bactérias, esporos de fungos e pólen. Para estudar em conjunto toda esta biodiversidade no ar urbano, surge na Comunidade de Madrid o consórcio pluridisciplinar AIRBIOTA-CM que integra cinco grupos de investigação de áreas muito distintas, visando obter uma visão conjunta sobre a composição e dinâmica das partículas biológicas do ar, otimizando os sistemas de amostragem e análise. As propostas mais recentes de investigação iniciadas por este consórcio são a utilização de técnicas inovadoras de genética molecular como a sequenciação massiva aplicada em metagenómica ("NextGenerationSequencing", NGS) e o uso de novas estratégias de captação, como a utilização de aeronaves não tripuladas para obtenção de amostras em diferentes alturas e localizações geográficas urbanas que *a priori* podem ter uma composição diferente da biota e tenham uma atividade humana relevante. O projeto foi iniciado no outono de 2014 e os resultados preliminares apresentados são os obtidos pela análise morfológica tradicional e a pela análise do ADN do pólen de uma mesma amostra procedente de um captador polínico Burkard. Os resultados evidenciam que os captadores tipo Hirst utilizados pelas redes aerobiológicas podem utilizar-se também em estudos de metagenómica e que os dados obtidos mediante a aplicação de ambos os métodos de análise coincidem amplamente, o que revela que esta nova metodologia constitui uma boa aproximação e possível alternativa à análise morfológica, ainda que sejam necessários mais estudos comparativos para uma melhor adaptação desta tecnologia.

Palavras-chave: aerobiologia; metagenómica; pólen; Madrid.

INTRODUCCIÓN

En el bioaerosol atmosférico podemos encontrar una gran diversidad de materiales y estructuras biológicas como microorganismos (virus, bacterias,

algas), unidades de dispersión (polen, esporas, semillas diminutas), fragmentos de hongos, plantas y animales, así como excreciones de los organismos biológicos. Generalmente el estudio de cada grupo o categoría se aborda por separado y con métodos muy diversos. Por

ello, actualmente, el nivel de conocimiento que tenemos de cada una de las categorías de partículas biológicas atmosféricas y de sus posibles impactos es muy diferente¹.

El polen procedente de las plantas con flores y las esporas generadas por diversos hongos saprófitos (mohos) que degradan la materia orgánica, son actualmente las partículas atmosféricas más estudiadas por su importancia como aeroalérgenos. La evidente relación entre la presencia de polen en el aire ambiente y las afecciones alérgicas, está en el origen de las redes aerobiológicas para el control rutinario del polen atmosférico, que desde los años 80 del pasado siglo se han desarrollado principalmente en Europa (<https://www.polleninfo.org/>) y América del norte (<http://www.aaaai.org/global/nab-pollen-counts>). Estas redes generalmente utilizan una metodología estandarizada. Cada estación aerobiológica, equipada con un captador volumétrico tipo Hirst, realiza un muestreo continuo de las partículas atmosféricas. Se obtiene una muestra diaria, que es una preparación microscópica, que posteriormente se analizará al microscopio óptico, identificando y contando, tanto los granos de polen como las esporas fúngicas presentes en la muestra. La identificación se basa en la morfología de estas partículas, que es específica de determinados grupos de plantas u hongos; como resultado del análisis de cada muestra obtenemos una relación de tipos morfológicos de polen o esporas (espectro diario) cuantificados mediante el valor medio diario por metro cúbico de aire.

Algunos estudios recientes^{2,3} sugieren que el conjunto de microorganismos del aire constituyen un ecosistema propio, la "aerobiota", complejo y parcialmente desconocido. Por ello, desde AIRBIOTA-CM nos propusimos como objetivo determinar la cantidad y diversidad de la aerobiota en la atmósfera urbana, desde un planteamiento pluridisciplinar, innovador e integrador⁴. El consorcio AIRBIOTA-CM está integrado por cinco grupos de investigación de la Comunidad de Madrid especializados en diferentes áreas: virología (INMUNOVIR, CSIC), bacterias y hongos (BIO-MAT, UPM), polen y redes aerobiológicas (AER-MAD-UCM), aeronaves no tripuladas o RPAS (CVG-UPM) y biología de sistemas (BioSysBio, UAM). Los aspectos más innovadores de nuestro proyecto residen en el estudio de la diversidad de partículas atmosféricas (virus, bacterias, hongos y polen) en su conjunto, como comunidad de organismos del aire y en la metodología a utilizar, que incluye la utilización de técnicas innovadoras de genética molecular como la secuenciación masiva aplicada en metagenómica ("Next Generation Sequencing", NGS). Dicha técnica permite la identificación de organismos a

partir de muestras ambientales complejas empleando el análisis del material genético (ADN) presente en ellas. Una gran ventaja frente a los métodos tradicionales es que la metagenómica no requiere el aislamiento y cultivo previo de los agentes biológicos, realizando la extracción del ADN directamente a partir de las muestras recogidas. Además de la diversidad pretendemos analizar también las variaciones en la composición y cantidad del bioaerosol atmosférico en las diferentes estaciones del año y en diferentes localidades de la Comunidad, con la finalidad de modelizar dicha aerobiota y establecer mapas de distribución. Para el muestreo de las partículas biológicas atmosféricas a diferentes alturas o en lugares de difícil acceso, proyectamos utilizar aeronaves no tripuladas (RPAS, drones), equipadas con captadores adaptados a las características de estos aparatos⁵.

En el presente trabajo presentamos los resultados de un ensayo preliminar realizado con un captador tipo Hirst (de uso general en los estudios de aerobiología) para comprobar si la muestra obtenida con el mismo, permitía la extracción del ADN de las partículas biológicas retenidas, para su posterior secuenciación e identificación por NGS. También hemos querido comparar y valorar los resultados obtenidos mediante el análisis morfológico tradicional y los aportados por la secuenciación del ADN.

MATERIAL Y MÉTODOS

TOMA DE MUESTRAS

Para la toma de muestras se empleó un captador volumétrico tipo Hirst (Burkard®) instalado en la terraza del edificio de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España), perteneciente a la Red Palinológica de la Comunidad de Madrid desde 1993 (Red Palinocam). Se recolectó una muestra de 7 días (2-9 de marzo de 2015). La cinta de Melinex sobre la que se recoge la muestra, se cortó por la mitad longitudinalmente, una mitad se destinó al análisis morfológico tradicional por microscopía óptica y la otra mitad se utilizó para la identificación del polen mediante NGS. La muestra analizada corresponde a una semana completa porque es necesario muestrear un volumen de aire suficiente para poder extraer el ADN.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Con la mitad de la muestra semanal se realizaron las preparaciones microscópicas sobre las que posteriormente se hizo el recuento e identificación de los granos de polen presentes siguiendo el procedimiento habitual en este tipo de análisis⁶.

EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR

La extracción de ADN a partir del material biológico retenido en la cinta captadora, se realizó siguiendo las indicaciones del kit comercial de purificación *PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories)*. La detección de ADN de origen vegetal en las muestras se realizó por PCR empleando la siguiente pareja de *primers*: rbcLa-F: 5'ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC3', y rbcLa-R: 5'GTAAAATCAAGTCCACCRG3⁸, que amplifican parcialmente el gen *rbcL* (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa, RuBisCO). Usando como molde 1 µL del ADN purificado, la reacción de PCR se realizó mediante el siguiente programa: 5 min de desnaturalización a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C y 1 min de extensión a 72 °C, más 10 min a 72 °C de extensión final. 10 µL de cada reacción fueron cargados en un gel de agarosa 1 % para visualizar los resultados.

SECUENCIACIÓN MASIVA

El ADN purificado se analizó generando amplicones del gen 18S empleando los primers 563f: 5'GCCAGCAVCYCGGTAAY3', y 1132R: 5'CCGTC AATTHCTTYAART3⁹. Estos amplicones fueron secuenciados mediante la tecnología de *Illumina*® Miseq en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (Madrid, España). El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó mediante el software de acceso libre Qiime¹⁰ incorporando la base de datos Silva¹¹ para la asignación taxonómica.

RESULTADOS

Exponemos a continuación los resultados preliminares obtenidos en este primer muestreo realizado del 2 al 9 de marzo de 2015 en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, perteneciente a la Red Palinocam, con el objetivo de verificar si los captadores de tipo Hirst, además de su uso tradicional pueden emplearse para la obtención de muestras utilizables en estudios metagenómicos del aire.

Los resultados del análisis morfológico del polen al microscopio óptico para la semana del muestreo se recogen en la tabla 1.

Se han identificado doce tipos polínicos diferentes, referidos a diversos rangos taxonómicos. En la mayoría de los casos la identificación se ha hecho a nivel de género, en tres casos (Pinaceae, Poaceae, Urticaceae) el polen solo ha podido reconocerse como perteneciente a una familia y por último el tipo morfológico Cupressaceae/Taxaceae que incluye el polen procedente de varias familias y que resultó el tipo polínico mayoritario, representando el

48,41 % del polen total semanal. El siguiente polen más abundante fue el de los chopos (*Populus*) que alcanzó el 28,27 % del polen total.

Tabla 1. Número de granos de polen/semana (N°GP/S) de cada uno de los tipos morfológico identificados y porcentaje de cada uno de ellos sobre el polen total

Tipo polínico	N°GP/S	% PT
Cupressaceae/Taxaceae	1846	48,41
Pinaceae	3	0,08
Poaceae (=Gramineae)	40	1,05
<i>Alnus</i>	71	1,86
<i>Corylus</i>	11	0,29
<i>Quercus</i>	6	0,16
<i>Fraxinus</i>	209	5,48
<i>Plantago</i>	1	0,03
<i>Populus</i>	1078	28,27
<i>Salix</i>	10	0,26
<i>Ulmus</i>	451	11,83
Urticaceae	85	2,23
No identificados	2	0,05
Polen total	3813	100,00

En cuanto a los estudios de identificación mediante ADN, primero se comprobó si es posible purificar ADN del polen de las plantas empleando este método de muestreo. Para ello, se trató de detectar el gen *rbcL* (subunidad grande de la enzima Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa, conocida como RuBisCO presente en las plantas e implicada en la fijación del CO₂ y en la fotorrespiración) por PCR a partir del ADN purificado de dicha muestra. Como se observa en la figura 1, obtuvimos un producto de amplificación de dicho gen (calle 2), confirmando que es posible la extracción de material genético vegetal usando este procedimiento.

A continuación, el material genético purificado se empleó para la identificación de plantas mediante técnicas de secuenciación masiva del ADN y su posterior asignación taxonómica (ver Material y Métodos). Como se muestra en la tabla 2, se han identificado de forma precisa hasta 12 órdenes de espermatófitos, siendo Coniferales y Malpighiales los grupos mayoritariamente detectados mediante secuenciación de su ADN. Además un 1% de secuencias fueron asignadas a la clase Liliopsida (monocotiledóneas) sin precisar órdenes.

Figura 1. Detección de ADN de plantas en una muestra semanal obtenida con el captador tipo Hirst. Calle 1: marcador de peso molecular de ADN; Calle 2: amplificación parcial del gen *rbcL* en la muestra; Calle 3: control negativo (captador sin conectar)

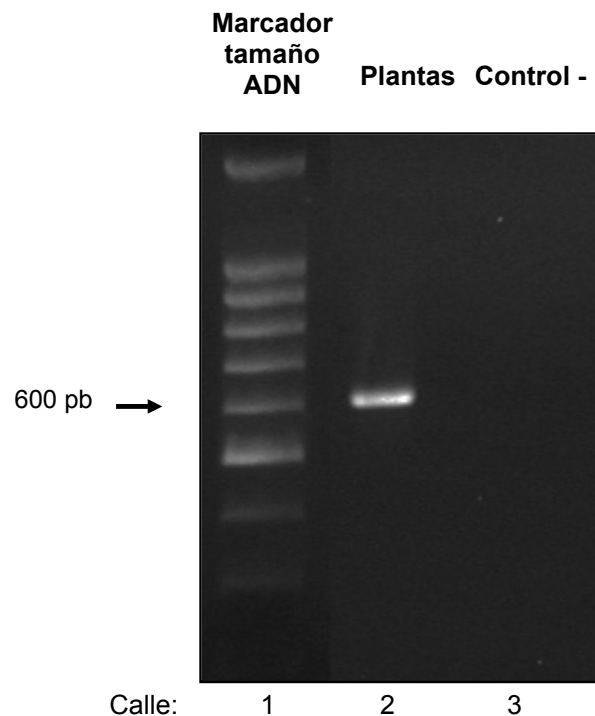


Tabla 2. Asignación taxonómica y abundancia relativa de los resultados obtenidos por NGS referentes a espermatófitos

Taxon	Abundancia relativa (% secuencias ADN)
Coniferales	69
Malpighiales	17
Myrtales	6
Fagales	2
Rosales	2
Fabales	0,1
Malvales	0,05
Lamiales	0,02
Saxifragales	0,006
Santalales	0,002
Solanales	0,002
Geraniales	0,0008
Liliopsida	1
Sin asignar	3
Total	100

Puesto que los resultados de la secuenciación de ADN se refieren principalmente a órdenes las comparaciones de los resultados obtenidos por el análisis morfológico del polen y por secuenciación las haremos a nivel del rango taxonómico orden. Para ello presentamos la tabla 3. Queda en evidencia que los dos tipos polínicos mayoritarios en el análisis morfológico fueron Cupressaceae/Taxaceae (Orden Pinales) y *Populus* (Orden Malpighiales) y que el mayor porcentaje de ADN de espermatófitos fue el asignado a estos dos órdenes. Los siete órdenes no detectados en el análisis morfológico del polen y detectados mediante secuenciación, lo fueron con porcentajes de secuencias muy bajos.

Tabla 3. Resultados del análisis morfológico del polen al microscopio óptico y resultados obtenidos mediante la secuenciación de ADN

ANÁLISIS MORFOLÓGICO				SECUENCIACIÓN	
Tipo polínico	Orden	% PT	%PT	% ADN espermatofitos	Orden
Cupress/Taxac	Coniferales	48,41	48,49	69	Coniferales
Pinaceae	Coniferales	0,08			
<i>Alnus</i>	Fagales	1,86	2,31	2	Fagales
<i>Corylus</i>	Fagales	0,29			
<i>Quercus</i>	Fagales	0,16			
<i>Fraxinus</i>	Lamiales	5,48	5,51	0,02	Lamiales
<i>Plantago</i>	Lamiales	0,03			
<i>Populus</i>	Malpighiales	28,27	28,53	17	Malpighiales
<i>Salix</i>	Malpighiales	0,26			
<i>Ulmus</i>	Rosales	11,83	14,06	2	Rosales
Urticaceae	Rosales	2,23			
Poaceae	Poales	1,05	1	1	Liliopsida (Poales)
	Fabales		No detectado	0,1	Fabales
	Geraniales		No detectado	0,0008	Geraniales
	Malvales		No detectado	0,05	Malvales
	Myrtales		No detectado	6	Myrtales
	Santalales		No detectado	0,002	Santalales
	Saxifragales		No detectado	0,006	Saxifragales
	Solanales		No detectado	0,002	Solanales
No identificado		0,05		3	Sin asignar

DISCUSIÓN

Los resultados expuestos permiten constatar, en primer lugar, que los captadores volumétricos tipo Hirst se pueden utilizar, además de para el muestreo rutinario del polen atmosférico, para la obtención del ADN del bioaerosol atmosférico, a partir de una única muestra semanal. Esto tiene la ventaja de que nos permite comparar los resultados de la aplicación de ambas metodologías en la identificación del polen atmosférico (tabla 3). Hasta el momento estos captadores volumétricos han sido utilizados en multitud de estudios aerobiológicos y en el control rutinario del polen atmosférico que llevan a cabo las redes aerobiológicas, pero el análisis de las muestras siempre se ha realizado mediante la identificación visual del polen y esporas de las mismas al microscopio óptico. En los últimos años se han publicado algunos artículos que utilizaron este tipo de captadores en estudios genómicos¹⁴ pero no tenemos

referencias de su utilización en metagenómica.

El recuento e identificación del polen al microscopio óptico es un procedimiento largo y costoso, que no puede realizarse de forma automática y necesita personal con una formación específica. En cambio el NGS no requiere esta formación especializada y la identificación de nuevos grupos/taxones es relativamente fácil incorporando las secuencias a la base de datos para la asignación taxonómica. Se evitan así las dudas en la identificación y las limitaciones del análisis morfológico y se ahorra tiempo de trabajo frente al microscopio.

La metodología de NGS está muy desarrollada y es fiable para bacterias, pero su uso está menos extendido en hongos y plantas, por lo que se requieren más estudios para ajustar y afinar los resultados. En este sentido, uno de los principales inconvenientes es que la identificación recae sobre una base de datos. Así, por ejemplo, en el

análisis morfológico se detecta un alto porcentaje de polen de *Ulmus* (olmos) y *Urticaceae*, plantas situadas actualmente en el orden *Rosales*, al que el NGS le asigna sólo un 2 % de secuencias. Una posible explicación es que no existen secuencias de *Ulmus* en la base de datos empleada en este análisis (*Silva release 111*¹¹). Otro interrogante es el planteado por el orden *Myrtales* con un 6 % de secuencias asignadas y que no aparece en el análisis morfológico. Por los datos que tenemos sobre polen atmosférico en la Comunidad de Madrid, sabemos que el único tipo polínico detectado en el aire de este orden es el de *Eucalyptus* (*Myrtaceae*, *Myrtales*), que solo aparece en los meses de verano y con niveles muy bajos con totales anuales que varían entre 10 y 200 granos de polen año. En Madrid la presencia de *Eucalyptus* es escasa por lo que no es esperable el resultado obtenido, y nos evidencia la necesidad de más estudios comparativos.

Como la identificación en NGS se hace por caracteres genéticos (ADN) y no por caracteres morfológicos (tipos polínicos), se puede llegar a una asignación taxonómica más precisa siempre que la región del ADN analizada lo permita. Como puede verse en la tabla 3, el análisis morfológico identifica seis órdenes mientras que los resultados de NGS identifican estos seis órdenes, más otros seis no detectados por morfología, es decir, se ha detectado mayor biodiversidad. Aunque la identificación a nivel de orden no es lo deseable por el momento, no ha sido posible precisar más debido a las carencias de la base de datos actual y a que el 18S no es el mejor marcador para la identificación de especies de plantas.

Un último inconveniente en la comparación de los resultados, es que los valores obtenidos por NGS son abundancias relativas, no granos de polen, lo que puede dificultar su interpretación. Una mejor aproximación sería la secuenciación denominada en la bibliografía especializada “*shotgun*”, pero su coste es todavía elevado para estos estudios.

CONCLUSIÓN

Estos resultados preliminares confirman que, en principio, las técnicas de secuenciación masiva del ADN pueden emplearse para la identificación y caracterización del polen atmosférico utilizando los captadores tipo Hirst, de uso habitual en las redes aerobiológicas. Aunque los resultados son prometedores, todavía son necesarios considerables avances para la incorporación de NGS como una alternativa fiable. En concreto, se requiere la elaboración de una base de datos de secuencias depurada y fiable para la identificación taxonómica, así como el desarrollo de una metodología que permita una extrapolación entre las abundancias relativas estimadas

por metagenómica y la abundancia real en granos de polen. Además, se hace imprescindible la elaboración de más trabajos comparativos de identificación entre estas nuevas metodologías y los estudios tradicionales para poder alcanzar una caracterización precisa y suficiente de la aerobiota en su conjunto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Després V, Huffman JA, Burrows SM, et ál. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B*. 2012; 64:15 598. doi: 10.3402/tellusb.v64i0.15598.
2. Bertolini V, Gandolfi I, Ambrosini R, et ál. Temporal variability and effect of environmental variables on airborne bacterial communities in an urban area of Northern Italy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 97:6561-70. doi: 10.1007/s00253-012-4450-0.
3. Bowers RM, McLetchie S, Knight R, Fierer N. Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of potential source environments. *ISME J*. 2011; 5:601-12. doi: 10.1038/ismej.2010.167.
4. Gutiérrez AM, Ferencova Z, Alcamí A, et ál. O-52. Estudio integral de la “aerobiota” en la Comunidad de Madrid (programa AIRBIOTA-CM). *Rev. salud ambient.* 2015;15(Espec. Congr.): 134.
5. Núñez A, García AM, Gutiérrez, AM, et ál. Incorporación del uso de los UAV para analizar la influencia de la altura en la calidad biológica del aire. Congreso CivilDRON’16, Madrid, 2016.
6. Galán C, Cariñanos P, Alcázar P, Domínguez-Vilches E. Spanish aerobiology network (REA) management and quality manual. Córdoba: Servicio de Publicaciones Universidad de Córdoba. 2007.
7. Levin RA, Wagner WL, Hoch PC, et ál. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcl* and *ndhF* data. *Am J Bot.* 2003; 90(1):107-15. doi: 10.3732/ajb.90.1.107.
8. Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, et ál. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106(44):18621-6. doi: 10.1073/pnas.0909820106.
9. Hugerth LW, Muller EE, Hu YO, et ál. Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS One* 2014; 9(4):e95567. doi: 10.1371/journal.pone.0095567.
10. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et ál. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010; doi:10.1038/nmeth.f.303.
11. Quast C, Priesse E, Yilmaz P, et ál. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (Silva_111):D590-6. doi: 10.1093/nar/gks1219. Epub 2012 Nov 28.
12. Calderon C, Ward E, Freeman J, McCartney A. Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *J Aerosol Sci.* 2002; 33:283-96.