

## El microbioma urbano: estudio del aire de la Ciudad de México

Universidad Autonoma Metropolitana

Mariana Peimbert

### Participantes

Luis D. Alcaraz Peraza (investigador)

Carolina González Cedillo (estudiante)

Grecia Moreno Chávez (estudiante)

Estudiantes e investigadores que se incorporen posteriormente.

### Resumen

En la frontera de la investigación en microbiología urbana, este proyecto se propone abordar la complejidad del microbioma aéreo en la Ciudad de México. A pesar de los avances recientes, el conocimiento sobre los microbiomas urbanos es insuficiente, especialmente en lo que respecta a su densidad microbiana en el aire. Con un enfoque innovador, aplicaremos técnicas de colecta de partículas virales y métodos moleculares avanzados, incluyendo secuenciación masiva y PCR cuantitativo, para capturar un espectro más amplio de microorganismos, incluyendo virus. Además, se pondrá un énfasis particular en la identificación de genes de resistencia a antibióticos y genes virales. Nuestra investigación evaluará cómo factores urbanos, climáticos y biológicos inciden en la composición microbiana, retando la presunción de homogeneidad en el aire de la Ciudad de México.

Este estudio se llevará a cabo bajo el paradigma "One Health" que vincula la salud humana a la animal y ambiental, por lo que los resultados del mismo podrán guiar las políticas de salud pública y la planificación urbana sostenible, promoviendo un bienestar integrado en nuestras comunidades y entornos.

### Objetivo General

Identificar y analizar las variaciones en las comunidades microbianas presentes en el aire de distintas zonas de la Ciudad de México, tomando en cuenta factores como la urbanización, la vegetación y las condiciones climáticas.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar la composición y diversidad de bacterias y hongos en el aire urbano utilizando secuenciación de amplicones de 16S y ITS para profundizar en la comprensión de la ecología microbiana urbana.
- Evaluar la influencia de la vegetación urbana en la diversidad y variabilidad estacional del microbioma aéreo para informar estrategias de planificación urbana que fomenten la salud pública.
- Determinar la prevalencia y distribución de la resistencia a antibióticos en los microorganismos del aire urbano para entender mejor la propagación de patógenos resistentes que sirvan para desarrollar estrategias de intervención.
- Identificar la presencia de organismos patógenos en el aire urbano mediante marcadores moleculares específicos para mejorar la vigilancia epidemiológica.
- Investigar la presencia de cepas de virus respiratorios de RNA en ambientes urbanos y su relación con cepas identificadas en entornos hospitalarios.

### **Descripción de la propuesta**

La investigación de microbiomas ha experimentado un auge significativo en los últimos años. Sin embargo, existe un vacío notable en nuestro entendimiento de los microbiomas urbanos, particularmente aquellos que pueblan el aire de nuestras ciudades. Estos entornos aéreos urbanos presentan un desafío único debido a su baja densidad microbiana, lo que requiere un enfoque metodológico novedoso. En ese sentido proponemos dos innovaciones metodológicas importantes en el campo, primero usaremos un tipo de colector que permite capturar partículas virales (partículas suspendidas de 0.5 micras, PM 0.5) y por otro lado además de identificar bacterias y hongos, se buscarán genes de resistencia a antibióticos y se enriquecerán marcadores moleculares específicos para bacterias patógenas y genes virales. Utilizaremos técnicas moleculares de secuenciación masiva, PCR cuantitativo además de técnicas clásicas de microbiología.

En este proyecto proponemos la exploración de la diversidad y dinámicas del microbioma aéreo urbano, con un interés especial en entender cómo las variaciones urbanísticas, climáticas y biológicas, afectan la composición de estas comunidades. La relevancia de esta propuesta de investigación trasciende el ámbito académico, pudiendo tener implicaciones significativas en la salud pública, la planificación urbana y las políticas medioambientales.

### **Antecedentes:**

La atmósfera terrestre, con su alta radiación solar, baja humedad y nutrientes, y su gran capacidad de dispersión, se considera un entorno extremo para la vida. Sin embargo, sabemos que los microorganismos no solo pueden sobrevivir sino también mantenerse metabólicamente activos en tales condiciones [Gandolfi et al 2013]. Tradicionalmente, la caracterización de microorganismos aerotransportados ha dependido de métodos basados en cultivos, lo que limitaba nuestra comprensión a aquellos que podían crecer en entornos de laboratorio [Du et al., 2018; Becsei et al., 2021].

Con el avance de la secuenciación de nueva generación (NGS), la caracterización del aerobioma en entornos urbanos ha alcanzado una nueva dimensión, a pesar de esto en julio del año pasado existían sólo 24 artículos sobre el tema [Franchitti et al., 2022]. Mediante el uso técnicas de NGS en muestras de aire filtrado (i.e. partículas en suspensión PM10 y PM2.5) se ha logrado mapear la diversidad microbiológica en diferentes ciudades, revelando la predominancia de filo bacterianos como Proteobacteria Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria [Xu et al., 202; González et al 2021; Chen et al., 2021]. Estos estudios han sugerido que la estacionalidad influye en la composición bacteriana del aire. Por ejemplo, en China, Corea del Sur y Japón observaron que la estacionalidad tenía un impacto mayor que la ubicación geográfica [Lee et al 2017]. Esto también se observa en el análisis durante un año de dos puntos de la Cd. Mx. [Calderón et al., 2021].

La contaminación atmosférica también juega un papel importante, afectando tanto la riqueza de especies como la abundancia relativa de microorganismos en el aerobioma [Chen et al., 2021; Fan et al., 2019], lo que sugiere que un incremento en el índice de calidad del aire podría estar asociado con una disminución en la riqueza de especies [Du et al., 2018; Wang et al 2021]. Además, hay evidencia de que la estructura de la comunidad microbiana está correlacionada con factores atmosféricos como la temperatura y la velocidad del viento [Uetake et al., 2019].

Estos hallazgos son relevantes para la salud pública, ya que una disminución en la diversidad microbiana urbana se ha asociado con un incremento en síndromes respiratorios como el asma y las alergias [Flies et al., 2019]. Es evidente que tanto la diversidad microbiana como la exposición a patógenos en el aire tienen implicaciones para la salud humana y el desarrollo de políticas urbanas de salud. Lo anterior subraya la necesidad de estudios más detallados para comprender cómo es el aerobioma urbano y su impacto en nuestra vida cotidiana.

Este proyecto representa una continuación natural de nuestros estudios previos sobre los microbiomas urbanos en la red del metro de la Ciudad de México [Hernández et al., 2020; Vargas et al., 2020; Peimbert, Alcaraz 2022]. Nuestra experiencia ha sentado las bases metodológicas y teóricas para abordar este estudio ambicioso y complejo. Disponemos de las instalaciones, equipo y el conocimiento para la recolección y análisis de muestras microbianas, así como para la interpretación de los datos obtenidos en contextos urbanos.

### **Preguntas de investigación**

- ¿Cómo varían las comunidades de bacterias y hongos en el aire de la Cd. Mx. en diferentes ubicaciones y en diferentes estaciones?

Los millones de personas que viven en esta ciudad están expuestos a estos microbiomas.

- ¿Cómo influye la vegetación urbana en la diversidad del microbioma aéreo?

En otro tipo de estudios, se ha propuesto que las áreas verdes pueden enriquecer el microbioma local y contribuir al bienestar.

- ¿Qué tipos de resistencia a los antibióticos se encuentran en los microorganismos del aire urbano?

Los organismos ambientales son reservorios de genes de resistencia a antibióticos.

- ¿Qué organismos patógenos están presentes en el aire urbano?

Se harán estudios con marcadores específicos.

- ¿Qué cepas de virus de RNA están presentes durante la temporada de invierno?

Las cepas ambientales pueden incluir virus de baja patogenicidad pero con relevancia evolutiva. De no ser técnicamente posible secuenciar, sólo se verificará por qPCR.

### **Pertinencia 800 caracteres**

Esta propuesta se alinea con los objetivos de la convocatoria y al enfoque de One Health, explorando de forma innovadora el microbioma aéreo urbano, un área emergente en la ciencia ambiental y de la salud pública. Al emplear técnicas avanzadas de secuenciación, abordamos controversias y desafíos metodológicos para generar conocimientos de frontera. Este enfoque interdisciplinario, que conecta la salud humana, animal y ambiental, promete descubrimientos significativos, expandiendo las fronteras del conocimiento y potencialmente abriendo nuevos campos de investigación. A largo plazo, los resultados tendrán un impacto en nuestra sociedad y cultura, guiando políticas de salud pública y planificación urbana bajo el paradigma de One Health, mejorando así la calidad de vida en las ciudades.

## Plan de trabajo

Para contestar las preguntas de investigación planteadas, las actividades se organizan en cuatro experimentos que contestan las siguientes preguntas:

1. Diversidad del aire de la ciudad (16S y ITS)

¿Cómo varían las comunidades de bacterias y hongos en el aire de la Cd. Mx. en diferentes ubicaciones y en diferentes estaciones?

¿Cómo influye la vegetación urbana en la diversidad del microbioma aéreo?

2. Detección de resistencia a antibióticos (metagenómica y cultivo)

¿Qué tipos de resistencia a los antibióticos se encuentran en los microorganismos del aire urbano?

3. Detección de patógenos (marcadores moleculares)

¿Qué organismos patógenos están presentes en el aire urbano?

4. Análisis de virus de RNA de importancia respiratoria (marcadores moleculares)

¿Qué cepas de virus de RNA están presentes durante la temporada de invierno?

Las actividades de los experimentos siguen la misma ruta en general, aunque en particular el procesamiento de las muestras va a tener variaciones en cada caso.

- a) Muestreo
- b) Procesamiento
- c) Secuenciación
- d) Análisis

### Cronograma de Actividades

	previo	año 1				año 2				año 3			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Diversidad del aire</b>													
Muestreo													
Procesamiento (16S, ITS)													
Secuenciación													
Análisis													
Escritura													
<b>Resistencia a Antibióticos</b>													
Muestreo													
Procesamiento (shootgun)													
Secuenciación													
Análisis													
Escritura													

Detección de patógenos				
Muestreo				
Procesamiento (genes específicos)				
Secuenciación				
Análisis				
Escritura				
Análisis viral				
Procesamiento preliminar				
Muestreo				
Procesamiento (RNA y qPCR)				
Secuenciación				
Análisis				
Escritura				
Otras actividades				
Formación de recursos humanos				
VIII Congreso de Bacterias				
Niñas en la Ciencia				
Lectura de literatura				

## Año 1 (2024)

### Entregables

1 Artículo de divulgación en la Revista Mensaje Bioquímico

2 Tesis, tesinas de licenciatura o informes finales de Servicio Social

Organización de evento del día internacional de las niñas y mujeres en la ciencia (11 de febrero)

Participación como ponente en el Taller de actualización Bioquímica 2024 (Facultad de Medicina, UNAM) dirigido a profesores de Bioquímica de licenciatura y bachillerato.

### Actividades

Las actividades de este proyecto se dividen en 4 experimentos

1. Diversidad del aire de la ciudad (año1: muestreo y procesamiento)
2. Detección de resistencia a antibióticos (año1: análisis y escritura)
3. Detección de patógenos (año:1 muestreo y procesamiento)
4. Análisis de virus de RNA de importancia respiratoria (año 1: muestreo y procesamiento preliminares)

## **Resultados esperados**

Se espera identificar una gama de genes de resistencia a antibióticos en microorganismos aéreos, lo cual es crucial para entender la propagación de resistencia en ambientes urbanos. Además de cumplir las metas, se espera que los avances experimentales fluyan sin contratiempo y poder tomar la decisión de cómo procesar las muestras para el análisis viral.

## **Metodología**

### **Muestreo, experimentos 1, 3 y 4**

La determinación de los sitios a muestrear es muy relevante, se buscará abarcar diferentes zonas de la ciudad. Algunas muestras se recolectarán en los alrededores de los pulmones de la ciudad (Chapultepec, Ciudad Universitaria y el Canal de Cuemanco). Otras muestras se tomarán de zonas con baja presencia y diversidad de vegetación como la Zona Centro, Azcapotzalco e Iztapalapa. Los lugares precisos se escogen con ayuda del Laboratorio de Análisis Socio Territorial (LAST) de la UAM. Para el experimento 4 solo se tomarán muestras en invierno.

Las muestras se colectan con el equipo Coriolis Micro, en 15 ml de PBS.

### **Procesamiento de muestras, experimentos 1, 3 y 4**

El DNA total se purifica mediante columnas de silicio utilizando los kits DNeasy PowerSoil® de Qiagen. Los DNA servirán de templado para hacer las PCR. En el caso del experimento 1 se amplificará la región hipervariable V3-V4 del gen ribosomal 16S que sirve para la identificación de bacterias, mientras que para la identificación de hongos se harán PCR para la región ITS2 (espaciador de transcrito interno de los genes ribosomales). Para el experimento 2 se utilizarán marcadores específicos para identificar cepas de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

Para el experimento 4 se utilizará el kit de extracción Qiaamp Viral RNA de Qiagen y será necesario hacer pruebas sobre el manejo de la muestra para optimizar la purificación de RNA viral. Se harán pruebas preliminares para detectar genes de tipificación del virus de influenza y SARS-Cov-2.

En todos los casos los amplicones se unirán los adaptadores de secuenciación multiplex de Illumina.

### **Análisis y escritura del experimento 2**

Actualmente estás muestras ya se tomaron y procesaron. Estas muestras se secuenciaron con una estrategia tipo escopeta. Las lecturas se filtran por calidad con Trimmomatic (Bolger, et al.,

2014) y se ensamblan con metaSPAdes (Nurk, et al., 2017). Las lecturas que no se pueden alinear, se ensamblan con Velvet (Zerbino y Birney, 2008). Con los contigs se hace la predicción de los marcos de lectura abiertos usando Prodigal (Hyatt et al., 2010). La asignación taxonómica se lleva a cabo con los marcos de lectura abiertos con Kraken (Wood y Salzberg, 2014) y la base de datos de RefSeq (Pruitt, Tatusova y Maglott, 2007). Para la identificación de genes de resistencia se utiliza el programa BLASTp (Camacho et al., 2009) y la base de datos de CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (McArthur et al., 2013).

## **Año 2 (2025)**

### **Entregables**

1 Artículo de investigación en revista internacional indizada  
Presentación en el VIII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias (SMB)  
1 Tesis, tesina de licenciatura o informe final de Servicio Social  
Organización de evento del día internacional de las niñas y mujeres en la ciencia (11 de febrero)  
Participación en un evento de divulgación y de no ser posible elaboración de un video corto de divulgación  
Las secuencias obtenidas serán accesibles en las bases de datos internacionales (NCBI y EBI)

### **Actividades**

Las actividades de este proyecto se dividen en 4 experimentos

1. Diversidad del aire de la ciudad (año 2: muestreo, procesamiento y análisis)
2. Detección de resistencia a antibióticos (año 2: publicación)
3. Detección de patógenos (año 2: muestreo, procesamiento y análisis)
4. Análisis de virus de RNA de importancia respiratoria (año 1: muestreo y procesamiento)

### **Resultados esperados**

Esperamos descubrir variaciones significativas en la composición de bacterias y hongos debido a factores como la urbanización, la vegetación y las condiciones climáticas estacionales, lo cual tiene implicaciones directas en la salud de millones de habitantes. No sabemos si podremos confirmar que las áreas verdes urbanas enriquecen el microbioma aéreo como sugieren los estudios de superficies en ambientes urbanos cerrados, o si observaremos la homogeneidad geográfica sugerida en experimentos de microbioma de aire.

Además de cumplir las metas, se espera que los avances experimentales fluyan sin contratiempo.



## Metodología

### Muestreo y procesamiento, experimentos 1, 3 y 4.

En este año se completarán la toma de muestra y procesamiento de muestras. Ver año 1.

### Análisis de secuencias, experimentos 1 y 3

Se filtrarán las secuencias por calidad y tamaño, solo se considerarán las secuencias con un valor de Phred mayor a 30 y un tamaño mayor a 400 pb. El ensamblado de las secuencias *pair-end* se realizará utilizando ensamblador de secuencias cortas PANDASEQ (Masella et al. 2012). Para el caso de las secuencias de 16S se removerán las quimeras utilizando Mothur y posteriormente se agruparán las secuencias en OTUs, usando como corte una identidad mayor al 97%. Los filotipos de los OTUs serán identificados con las bases de datos *Ribosomal Databank Project* and *Greengenes* (Cole et al. 2009; DeSantis et al 2006). La diversidad intra e inter específica y sus índices asociados como rarefacciones, Simpson, Shannon, ACE, CHAO1 y la distancia UNIFRAC se generarán mediante las líneas de análisis Qiime y Mothur (Caporaso et al. 2010; Schloss et al. 2009). Para los análisis de secuencias metagenómicas se utilizará el programa BLASTx (Altschul et al. 1997) para asignar las funciones y se utilizará el KEGG (Kanehisa y Goto 2000) para clasificar y ordenar los datos. Los análisis estadísticos multivariados se llevarán a cabo con el lenguaje R y sus bibliotecas *phyloseq*, *vegan*, *picante*, *ggplots* y *factominer*. Todas las secuencias y datos asociados se harán públicos en las bases de datos dedicadas al tema, en particular en el Sequence Read Archive (SRA) del NCBI.

## Año 3 (2026)

### Entregables

1 Artículo de investigación en revista internacional indizada

1 Tesis, tesina de licenciatura o informe final de Servicio Social

Organización de evento del día internacional de las niñas y mujeres en la ciencia (11 de febrero)

Participación en un evento de divulgación y de no ser posible elaboración de un video corto de divulgación

Las secuencias obtenidas serán accesibles en las bases de datos internacionales (NCBI y EBI)

### Actividades

Las actividades de este proyecto se dividen en 4 experimentos

1. Diversidad del aire de la ciudad (año 3: escritura y publicación)
2. Detección de resistencia a antibióticos (terminado)
3. Detección de patógenos (año 3: escritura y publicación)

4. Análisis de virus de RNA de importancia respiratoria (año 3: secuenciación, análisis, escritura)

### **Resultados esperados**

Esperamos determinar la presencia de cepas virales de RNA, incluyendo aquellas de baja patogenicidad pero con relevancia evolutiva y poder hacer un análisis filogenético de aquello que no llega a hospitales pero está presente en el ambiente. Este tipo de estudio sería realmente novedoso en la interpretación de la evolución viral.

Además de cumplir las metas, se espera que los avances experimentales fluyan sin contratiempo.

### **Metodología**

#### **Análisis, experimento 4**

En caso de ser posible la secuenciación, se llevará a cabo un ensamble pareado utilizando ensamblador de secuencias cortas PANDASEQ (Masella et al. 2012). Posteriormente se harán alineamientos múltiples con MAFFT (Katoh et al., 2019) y árboles filogenéticos con Phylot (Letunic, 2015). Se usarán como referencia las secuencias de diferentes cepas de circulación en los hospitales.

En caso de no ser posible la secuenciación, con los datos de qPCR se utilizará estadística clásica para identificar las correlaciones entre la abundancia de viral y los metadatos colectados.

### **Desglose financiero**

El Laboratorio de Mundos Minúsculos (UAM), en colaboración con el Laboratorio de Genómica Ambiental (UNAM), está equipado para ejecutar una amplia gama de técnicas tanto en microbiología clásica como en biología molecular. En el Laboratorio de Mundos Minúsculos, disponemos de equipos especializados como el "Coriolis Micro", que representa una innovación significativa en la recolección de muestras aéreas. Este equipo se distingue de los métodos tradicionales de impactación o filtrado en varios aspectos críticos: su principio radica en transferir partículas aéreas a una muestra líquida, lo cual permite superar las limitaciones de los métodos convencionales. Esta tecnología de muestreo líquido no solo mejora la eficiencia de captura de partículas aéreas, sino que también facilita una amplia gama de análisis subsiguientes, incluyendo técnicas moleculares avanzadas.

<https://www.bertin-technologies.com/product/air-samplers/coriolis-micro-air-sampler/>

	año 1	año 2	año 3
<b>Gasto corriente</b>			
Servicios especializados (NGS)	\$150,000	\$150,000	\$150,000
Becas estudiantes	\$100,000	\$100,000	\$100,000
Uso directo (consumibles laboratorio)	\$160,000	\$140,000	\$220,000
Publicaciones (Open Access)		\$30,000	\$30,000
<b>Gasto de inversión</b>			
Equipo de laboraotrio	\$90,000	\$80,000	\$0
<b>Total</b>	<b>\$500,000</b>	<b>\$500,000</b>	<b>\$500,000</b>

### Justificación

*Servicios Externos* (Secuenciación y Síntesis de Oligonucleótidos): Este proyecto se basa en la secuenciación de nueva generación (NGS) y también en la síntesis de oligonucleótidos para generar las bibliotecas. Estos servicios especializados no están disponibles en nuestro laboratorio. La secuenciación masiva se llevará a cabo en Langebio o en la Unidad Universitaria de secuenciación masiva (UNAM), la decisión dependerá de la cotización vigente y de los tiempos de entrega.

*Becas* (Estudiantes de Servicio Social o Tesistas): El involucramiento de estudiantes en el proyecto no solo es fundamental para su desarrollo educativo y profesional, sino que también es crucial para la recolección y análisis de muestras. Estos estudiantes, a través de sus becas, podrán dedicar el tiempo y el esfuerzo necesarios para contribuir significativamente al proyecto, ganando experiencia práctica en un estudio de vanguardia que aborda una cuestión de importancia global bajo el enfoque de One Health.

*Publicaciones*: El financiamiento para cubrir los gastos editoriales de las revistas de investigación garantizará que nuestros resultados sean accesibles (open access) y tengan un mayor visibilidad, promoviendo que nuestros resultados tengan un mayor impacto en otras investigaciones, políticas de salud pública y prácticas de planificación urbana.

*Consumibles de Laboratorio*: Reactivos, kits de purificación, kits para hacer bibliotecas, materiales de plástico y de vidrio son fundamentales para el procesamiento de muestras, la realización de pruebas y la garantía de condiciones estériles, asegurando la integridad y la precisión de nuestros resultados. La provisión adecuada de estos materiales es esencial para mantener la continuidad y la calidad del trabajo investigativo.

*Equipo (Balanza Analítica):* La adquisición de una balanza analítica es una inversión esencial para nuestro laboratorio, ya que este equipo permitirá realizar mediciones precisas y confiables de pequeñas cantidades de reactivos y muestras, un aspecto crítico en la investigación microbiológica. Esta herramienta no solo mejorará la calidad de nuestra investigación actual sobre el microbioma aéreo urbano, sino que también servirá para futuros proyectos. La balanza analítica es, por lo tanto, una inversión a largo plazo.

*Equipo (Transiluminador UV):* Este equipo es esencial para visualizar ácidos nucleicos, como el ADN y el ARN, después de su separación por electroforesis en gel, una práctica común en el estudio de los microbiomas. Su uso nos permitirá verificar la calidad y el tamaño de los fragmentos de ADN y ARN obtenidos de las purificaciones.

*Equipo (Secuenciador Nanopore):* La adquisición de un secuenciador Nanopore es una inversión estratégica para nuestro proyecto de investigación del microbioma aéreo urbano. Esta tecnología de secuenciación de última generación ayuda a una caracterización rápida de los microorganismos. La capacidad única de Nanopore para secuenciar moléculas de ADN y ARN largas nos permitirá obtener una visión más completa y detallada de la diversidad microbiana, incluyendo la identificación precisa de patógenos, genes de resistencia a antibióticos y secuencias virales.

### **Bibliografía más relevante**

1. Becsei, Á.; Solymosi, N.; Csabai, I.; Magyar, D. Detection of antimicrobial resistance genes in urban air. *MicrobiologyOpen* **2021**, 10, e1248.
2. Bowers, R.M.; Mccubbin, I.B.; Hallar, A.G.; Fierer, N. Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site. *Atmos. Environ.* **2012**, 50, 41–49
3. Calderón-Ezquerro, M.d.C.; Serrano-Silva, N.; Brunner-Mendoza, C. Aerobiological study of bacterial and fungal community composition in the atmosphere of Mexico City throughout an annual cycle. *Environ. Pollut.* **2021**, 278, 116858
4. Chen, H.; Du, R.; Zhang, Y.; Du, P.; Zhang, S.; Ren, W.; Yang, M. Evolution of PM 2.5 bacterial community structure in Beijing's suburban atmosphere. *Sci. Total Environ.* **2021**, 799, 149387.
5. Du, P.; Du, R.; Ren, W.; Lu, Z.; Zhang, Y.; Fu, P. Variations of bacteria and fungi in PM 2.5 in Beijing, China. *Atmos. Environ.* **2018**, 172, 55–64.
6. Fan, X.; Gao, J.; Pan, K.; Li, D.; Dai, H.; Li, X. More obvious air pollution impacts on variations in bacteria than fungi and their co-occurrences with ammonia-oxidizing microorganisms in. *Environ. Pollut.* **2019**, 251, 668–680.

7. Flies, E.J.; Mavoa, S.; Zosky, G.R.; Mantzioris, E.; Williams, C.; Eri, R.; Brook, B.W.; Buettel, J.C. Urban-associated diseases: Candidate diseases, environmental risk factors, and a path forward. *Environ. Int.* **2019**, *133*, 105187.
8. Franchitti, E.; Caredda, C.; Anedda, E.; Traversi, D. Urban Aerobiome and Effects on Human Health: A Systematic Review and Missing Evidence. *Atmosphere*. **2022**, *13*(7), 1148.
9. Gandolfi, I.; Bertolini, V.; Ambrosini, R.; Bestetti, G.; Franzetti, A. Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 4727–4736.
10. González-Martín, C.; Pérez-González, C.J.; González-Toril, E.; Expósito, F.J.; Aguilera, Á.; Díaz, J.P. Airborne Bacterial Community Composition According to Their Origin in Tenerife, Canary Islands. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 732961
11. Hernández, A. M., Vargas-Robles, D., Alcaraz, L. D., & Peimbert, M. (2020). Station and train surface microbiomes of Mexico City's metro (subway/underground). *Scientific Reports*, **2020**, *10*(1), 8798
12. Lee, J.Y.; Park, E.H.; Lee, S.; Ko, G.; Honda, Y.; Hashizume, M.; Deng, F.; Yi, S.; Kim, H. Airborne Bacterial Communities in Three East Asian Cities of China, South Korea, and Japan. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5545
13. Peimbert, M., & Alcaraz, L. D. Where environmental microbiome meets its host: Subway and passenger microbiome relationships. *Molecular Ecology*, **2023**, *32*(10), 2602–2618.
14. Uetake, J.; Tobo, Y.; Uji, Y.; Hill, T.C.J.; Demott, P.J. Seasonal Changes of Airborne Bacterial Communities Over Tokyo and Influence of Local Meteorology. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1572.
15. Vargas-Robles, D., Gonzalez-Cedillo, C., Hernandez, A. M., Alcaraz, L. D., & Peimbert, M. Passenger-surface microbiome interactions in the subway of Mexico City. *PLoS One*, **2020**, *15*(8), e0237272.
16. Wang, S.; Liu, W.; Li, J.; Sun, H.; Qian, Y.; Ding, L.; Ma, H.; Li, J. Seasonal variation characteristics of bacteria and fungi in pm2.5 in typical basin cities of Xi'an and Linfen, China. *Atmosphere* **2021**, *12*, 809
17. Xu, C.; Chen, J.; Wang, Z.; Chen, H.; Feng, H.; Wang, L.; Xie, Y.; Wang, Z.; Ye, X.; Kan, H.; et al. Diverse bacterial populations of PM2.5 in urban and suburb Shanghai, China. *Front. Environ. Sci. Eng.* **2021**, *15*, 37

*Imaginen un safari a través del aire de la ciudad, pero en lugar de animales, estamos buscando microbios. Nuestro proyecto es como una gran lupa que nos permite ver y estudiar estas pequeñas criaturas que comparten nuestro espacio urbano. Utilizando tecnología punta que puede capturar incluso los virus, nos proponemos investigar cómo cambian estas comunidades microbianas con las estaciones y su relación con la vegetación. Nuestro trabajo aspira a hacer que las ciudades sean lugares más seguros y saludables para todos.*

