

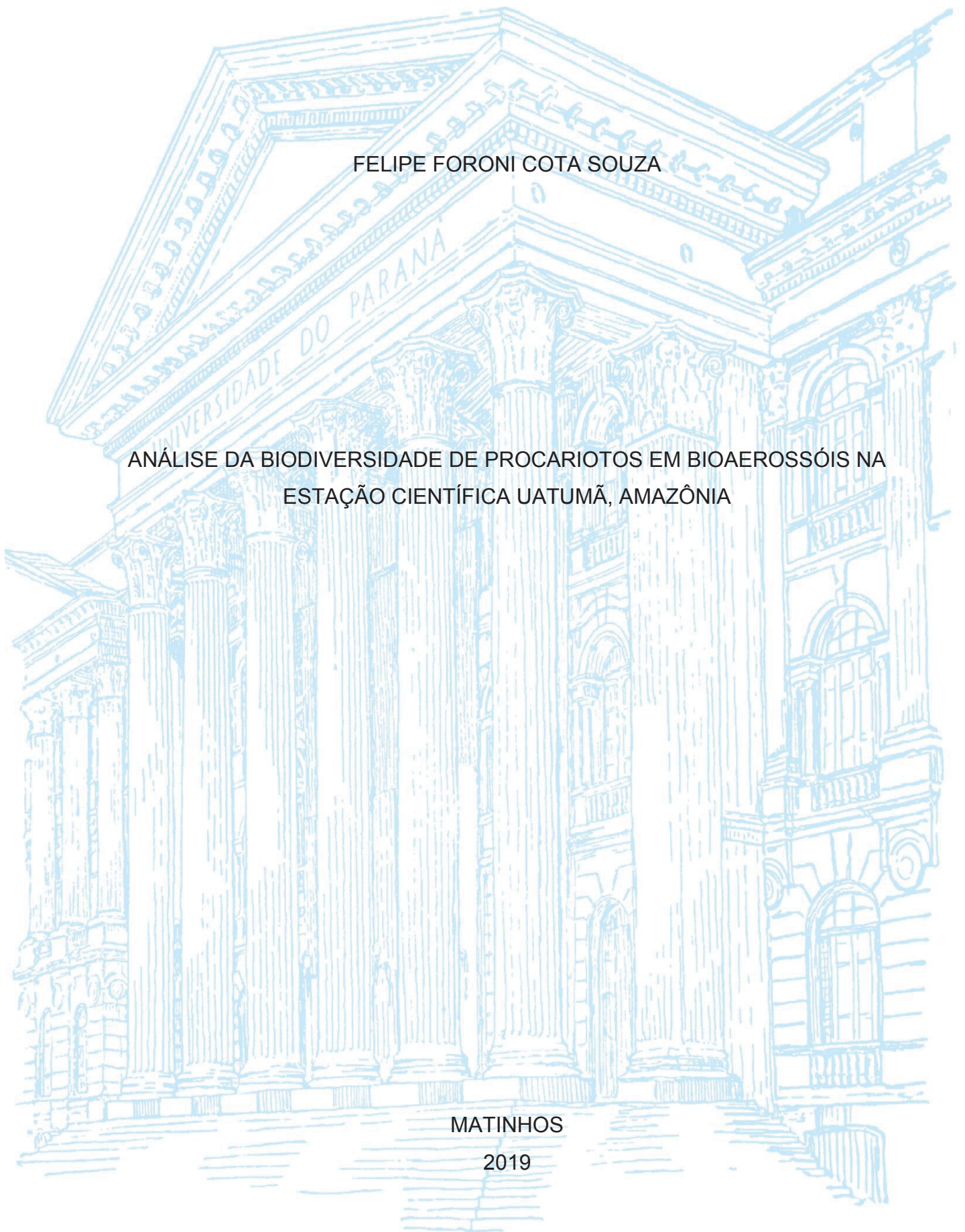
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE FORONI COTA SOUZA

ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE DE PROCARIOTOS EM BIOAEROSSÓIS NA
ESTAÇÃO CIENTÍFICA UATUMÃ, AMAZÔNIA

MATINHOS

2019



FELIPE FORONI COTA SOUZA

ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE DE PROCARIOTOS EM BIOAEROSSÓIS NA
ESTAÇÃO CIENTÍFICA UATUMÃ, AMAZÔNIA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento Territorial Sustentável, Universidade Federal do Paraná, Setor de Litoral como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Luciano F. Huergo

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo H. M. Godoi

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo A. Reis

MATINHOS

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte
Biblioteca da Universidade Federal do Paraná - Setor Litoral

S729 Souza, Felipe Foroni Cota
Análise da biodiversidade de procariotos em bioaerossóis na estação científica Uatumã, Amazônia / Felipe Foroni Cota Souza ; orientador Luciano F. Huergo . – 2019.
96 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná - Setor Litoral, Matinhos/PR, 2019.

1. Biodiversidade. 2. Procariotos. 3. Estação científica Uatumã. I. Dissertação (Mestrado) – Mestrado Profissional em Rede Nacional para o Ensino das Ciências Ambientais. II. Título.

CDD – 333.9516079



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR LITORAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DESENVOLVIMENTO
TERRITORIAL SUSTENTÁVEL - 40001016081P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em DESENVOLVIMENTO TERRITORIAL SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de FELIPE FORONI COTA SOUZA intitulada: **IDENTIFICAÇÃO DE BIODIVERSIDADE DE BIOAEROSSÓIS BACTERIANOS NA ESTAÇÃO CIENTÍFICA DO UATUMÃ, AMAZÔNIA**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

MATINHOS, 14 de Junho de 2019.


LUCIANO FERNANDES HÜERGO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LUIZ EVERSON DA SILVA
Avaliador Interno (UFPR)


FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Viver este momento de conclusão de um curso de pós-graduação não é um fato isolado em minha evolução, há uma cronologia de fatos, oportunidade e principalmente seres humanos que cada um, em cada momento de minha vida contribuiu para que agora eu possa viver este momento. Sendo assim, primeiramente agradeço a vida, à Deus e agradeço ao nosso Mestre, pela inspiração na caminhada. Hoje e sempre, sou grato!

Agradeço à minha família (e como agradeço). Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo apoio constante e principalmente pela mais bela vivência dessa vida que é ser filho de vocês e parte desta família. Agradeço ao meu amado irmão, meu melhor amigo, pelo companheirismo, pelo amor, pela alquimia, pelo Benjamin. Agradeço à minha amada irmã, pela paciência que teve todas as vezes que me ligou para conversar de noite e eu estava estudando. Agradeço à minha companheira Julia, pela paciência, pelo companheirismo e pelo amor. Agradeço à Carol, que veio trazer mais amor e alegria ainda em nossas vidas, pela presença e pelo título mais legal e divertido que já recebi, ser tio, do Benjamin, “O Gente Boa”, chegou trazendo alegria e amor. Agradeço a Zaya, Marrie e Yuki pelo companheirismo, madrugadas à fio, à frio, estudando.

Agradeço aos meus avós, aos meus tios e primos, pelo afeto, pelo apoio incondicional, incentivo e motivação antes e durante este ciclo.

Aos amigos de graduação que estiveram presentes, próximos ou à distância, aos amigos da turma PPGDTS 2017, aos amigos do Lab Móvel, aos amigos do Lab Air, aos amigos da Bioquímica, aos técnicos dos Laboratórios Didáticos da UFPR Litoral, aos funcionários e terceirizados da UFPR Litoral, à Fundação Araucária pela bolsa que me forneceu durante os meses do curso, meu muito obrigado!

Agradeço também o apoio e parceria de todos os profissionais envolvidos nesta pesquisa e que compõe o nosso grupo de pesquisa de bioaerossóis. Esta pesquisa é inteiramente interdisciplinar, realizada à muitas mãos e certamente consumiu muitas horas de trabalho de toda a equipe. Registro aqui meus agradecimentos: Daniel V. Rissi, Fabio O. Pedrosa, Emanuel M. Souza, Valter A. Baura, Rose A. Monteiro, Eduardo Balsanelli, Leonardo M. Cruz, Rodrigo A. F. Souza, Meinrat O. Andreae.

Agradeço a toda equipe do INPA e do Instituto Max Planck pela pré-disposição e colaboração. Todos os profissionais envolvidos na logística e manutenção do ATTO, Amauri, Andrew, Stefan, Antonio, André, Feliciano, Wallace, Nagibi e todos ou outros envolvidos em nossa primeira campanha de coleta, muito obrigado. Não posso deixar de mencionar a Juliana, amiga de LabAir e companheira de pesquisa no ATTO, Sebastian, Anywhere e Cybelli pela boa companhia e ajuda sempre que necessário.

Ao professor Luciando F. Huergo, registro aqui minha gratidão por todo conhecimento compartilhado, pela iniciação na bioquímica, pela ajuda, paciência, amizade, pelos resultados e pelas ondas. Tem sido estimulante e gratificante aprender contigo!

Ao professor Ricardo H. M. Godoi, deixo também meus agradecimentos pela confiança e oportunidade de realizar a pesquisa no ATTO. Que essa parceria seja longa, produtiva e duradoura, muitos resultados não de vir.

Ao professor Rodrigo A. Reis, agradeço todos os conhecimentos compartilhados, paciência, amizade e oportunidades ao longo desde seis anos de trabalho juntos.

Não poderia deixar de agradecer a todos outros autores que são citados direta ou indiretamente aqui, aqueles cientistas que antecederam este estudo e que de alguma forma contribuíram para que hoje este trabalho possa ser apresentado.

A todos, minha eterna gratidão.

*Prometemos uma vida de esbanjamento, e, no fundo,
constitui uma conta regressiva contra a natureza,
contra a humanidade no futuro.
Civilização contra a simplicidade, contra a sobriedade,
contra todos os ciclos naturais.*

*Ou pior: civilização contra a liberdade que supõe ter tempo
Para viver as relações humanas,
as únicas que transcendem:
o amor,
a amizade,
aventura,
solidariedade,
família.
Arrasamos a selva, as selvas verdadeiras,
e implantamos selvas anônimas de cimento.*

*Nossa época é portentosamente revolucionária
como não conheceu a história.
Mas não tem condução consciente,
ou ao menos condução simplesmente instintiva.
Muito menos, todavia, condução política organizada,
porque nem se quer tivemos filosofia precursora
ante a velocidade das mudanças que se acumularam.*

*Pensem que a vida humana é um milagre.
Que estamos vivos por um milagre
e nada vale mais que a vida.
E que nosso dever biológico, acima de todas as coisas,
é respeitar a vida e impulsioná-la, cuidá-la, procriá-la e
entender que a espécie é nosso "nós".*

RESUMO

O Brasil tem a maior porcentagem da biodiversidade do planeta, mantendo aproximadamente 20% de todas as espécies conhecidas. Bioaerossóis, são partículas associadas a compostos de origem biológica, de fonte natural ou antrópica, inclui os fungos e bactérias patogênicas e não patogênicas, viáveis e não viáveis, pólenes, algas, entre outros. São originários do solo, vegetação e superfícies aquáticas, como rios, baías e oceanos. A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo, é também considerada o bioma com maior biodiversidade do planeta. O presente estudo tem como objetivo investigar o microbioma da atmosfera nas proximidades da Torre Instant, localizada na Estação Científica do Uatumã, dentro da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã. Uma campanha de coleta no local foi realizada durante a estação seca, na segunda quinzena de agosto de 2018, através do Harvard Inertial Impactor, adaptado para coleta de partículas suspensas totais. Um número de amostras (n = 5) foi submetido à extração e cultura de células bacterianas viáveis em diferentes meios de cultura, contabilizando 78 isolados em todos os meios utilizados. Com a combinação de espectrometria de massa e os métodos de sequenciamento do rDNA16S, 14 isolados foram identificados como pertencentes aos filos Firmicutes e Actinobacteria. A segunda parte das amostras (n = 1) foi submetida à extração de rDNA metagenômico, seguida de análise taxonômica do sequenciamento massivo de um fragmento amplificado do gene 16S rDNA. Um total de 271.577 leituras com 250 pb foram obtidas pelo sequenciamento da amostra, das quais 197.970 (~ 72%) foram identificadas para o domínio Bacteria. Os filos identificados com as maiores abundâncias foram: Proteobacteria (36%), Actinobacteria (24%), Firmicutes (20%), Cyanobacteria (11%). Estes dados contribuem para o conhecimento sobre a biodiversidade de bioaerossóis em ambientes naturais e podem contribuir para o desenvolvimento de estudos sobre a dinâmica ecológica e ecossistêmica de procariotos na atmosfera.

Palavras chave: Bioaerossóis; Bactéria; Amazônia;

ABSTRACT

Brazil has the highest percentage of biodiversity on the planet, approximately 20% of all known species. Bioaerosols, are particles associated with compounds of biological origin, from natural or anthropogenic source, includes pathogenic and non-pathogenic fungi and bacteria, viable and non-viable, pollens, algae, among others. They originate from soil, vegetation and aquatic surfaces, such as rivers, bays and oceans. The Amazon Rainforest is the largest tropical forest in the world, it is also considered the biome with the greatest biodiversity on the planet. The present study aims to investigate the microbiome in the atmosphere in the vicinity of the Instant Tower, located in the Uatumã Scientific Station, within the Uatumã Sustainable Development Reserve. A collection campaign was conducted during the dry season, in the second half of August 2018, through the Harvard Inertial Impactor, adapted for collecting total suspended particulates. A number of samples (n = 5) were subjected to extraction and culture of viable bacterial cells in different culture media, counting 78 isolates in all media used. With the combination of mass spectrometry and rDNA16S sequencing methods, 14 isolates were identified as belonging to the Firmicutes and Actinobacteria phyla. The second part of the samples (n = 1) was submitted to metagenomic rDNA extraction, followed by taxonomic analysis of the massive sequencing of the 16S rDNA amplified fragment. A total of 271,577 readings with 250 bp were obtained from the sequencing of samples, of which 197,970 (~ 72%) were identified for the Bacteria domain. The phyla identified with the greatest abundances were: Proteobacteria (36%), Actinobacteria (24%), Firmicutes (20%), Cyanobacteria (11%). These data contribute to the knowledge about the biodiversity of bioaerosols in natural environments and can contribute to the development of studies on the ecological and ecosystem dynamics of prokaryotes in the atmosphere.

Key words: Bioaerosols; Bacteria; Amazon;

SUMÁRIO

SUMÁRIO	10
1 CAPÍTULO I	12
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.2 JUSTIFICATIVA	14
1.2.1 BIOAEROSSÓIS	14
1.2.2 OBSERVATÓRIO DA TORRE ALTA DA AMAZÔNIA (ATTO).....	15
1.3 OBJETIVOS	17
1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
1.4 REVISÃO DE LITERATURA	18
1.4.1 BIODIVERSIDADE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL	18
1.4.2 BIOAEROSSÓIS	20
1.4.3 BIOAEROSSÓIS BACTERIANOS	24
1.4.4 O BIOMA AMAZONIA E ASPECTOS BIOCLIMÁTICOS.....	25
1.4.5 MICROBIOMAS	27
1.4.6 ANÁLISE DE MASSAS PROTEICA POR MALDI-TOF MS.....	28
1.4.7 PCR E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RDNA	30
1.4.8 SEQUENCIAMENTO METAGENÔMICO.....	32
REFERÊNCIAS	34
2 CAPÍTULO II	47
2.1 INTRODUÇÃO	47
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.2.1 LOCAL DE COLETA	49
2.2.2 MÉTODOS DE COLETA	50
2.2.2.1 DESENHO AMOSTRAL	50
2.2.2.2 DISPOSIÇÃO DOS AMOSTRADORES NO PONTO DE COLETA.....	51
2.2.2.3 IMPACTADOR INERCIAL HARVARD	52
2.2.2.4 PROCEDIMENTOS DE COLETA.....	53
2.2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE	53
2.2.3.1 CULTIVO DE CÉLULAS VIÁVEIS	53
2.2.4 ARMAZENAMENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	54
2.2.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF	55
2.2.6 MANIPULAÇÃO MATERIAL GENÉTICO.....	57

2.2.6.1 EXTRAÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO DAS CULTURAS ISOLADAS	57
2.2.6.2 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO DE POLIMERASE	57
2.2.6.3 REAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	58
2.2.6.4 ANÁLISE DE SEQUENCIAS	58
2.3 RESULTADOS	59
2.3.1 CULTIVO DE BACTÉRIAS.....	59
2.3.2 ANALISE EM MALDI-TOF E <i>BIOTYPER</i>	61
2.3.3 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS DO GENE 16S rDNA.....	64
2.4 DISCUSSÃO	67
2.5 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO 1 – DATA E HORARIO DE COLETA.....	78
ANEXO 2 – MONITORAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS	79
ANEXO 3 – DENDROGRAMA DOS PERFIS PROTEICOS DA PRIMEIRA BATERIA DE ANÁLISE EM MALDI-TOF.....	80
3 CAPÍTULO III	81
ANNEX	91
4 CAPÍTULO IV	96

1 CAPÍTULO I

Este estudo está estruturado em 4 capítulos, o presente capítulo é introdutório, apresenta os temas que embasam a pesquisa. Os capítulos II e III, foram estruturados em formato de artigo. O segundo é referente ao estudo de biodiversidade de bioaerossóis procarióticos cultiváveis, este artigo ainda não foi submetido para a publicação em periódico. O terceiro corresponde ao estudo dos bioaerossóis procarióticos por análise metagenômica foi submetido para publicação em periódico científico, e segue no formato no qual foi submetido. E o capítulo IV reúne os resultados apresentados nos capítulos II e III com as considerações e conclusões do estudo.

1.1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade é amplamente reconhecida como área prioritária de investigação científica. A biodiversidade resulta de milhões de anos de evolução biológica e é um componente do sistema de suporte à vida de nosso planeta. Além do valor intrínseco de cada espécie, seu conjunto, bem como o conjunto de interações entre espécies e destas com o meio físico-químico, resultam em serviços ecossistêmicos imprescindíveis para manter a vida na Terra, tais como: regulação climática, ciclagem de nutrientes, formação de solos, fornecimento de água, entre outros, cujo valor é imensurável (BALMFORD et al., 2002; CONSTANZA et al., 1997; JOLY et al., 2011).

Esta pesquisa investigou a microbiota procariótica presente em aerossóis durante a estação seca, no sítio ATTO (*Amazon Tall Tower Observatory*) localizado na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã, no estado do Amazonas. Através de coletas *in loco* com amostradores atmosféricos localizados em diferentes alturas dentro do dossel da floresta Amazônica.

Trata-se de um estudo coletivo e interdisciplinar que envolveu uma ampla gama de métodos e profissionais de diferentes áreas. Após as coletas, as amostras passaram por uma triagem e foram submetidas a dois diferentes processos de análise molecular. Parte foi submetida a cultivo celular para identificação por espectrometria de massas proteica (MALDI-TOF), amplificação e sequenciamento do gene de rDNA

bacteriano 16S. E outra parte foi submetida a extração, amplificação e sequenciamento do material metagenômico da região V4 do gene de rDNA 16S.

Esta estratégia foi definida por dois fatores determinantes: 1) estima-se que apenas 1 a 2% dos microrganismos procarióticos são cultiváveis em laboratório (ULTEE et al., 2004; WADE, 2002; AMANN et al., 1990; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005); e 2) amostras atmosféricas são consideradas amostras com baixa concentração de material genético para análises metagenômicas (LUHUNG et al., 2015). Considerando essas informações, definimos nossos protocolos com métodos que nos permitissem obter a maior quantidade de informação sobre o microbioma.

Desta forma, estruturamos a apresentação deste estudo dividido em 4 capítulos, sendo o primeiro o capítulo introdutório, onde está sendo apresentado o tema de pesquisa e o presente estudo, os objetivos e a revisão bibliográfica. Os capítulos II e III serão apresentados em forma de artigos científicos, correspondendo o capítulo II ao estudo de biodiversidade de bioaerossóis procarióticos cultiváveis e o capítulo III correspondendo ao estudo dos bioaerossóis procarióticos por análise metagenômica. Por fim, o capítulo IV apresenta as considerações do autor sobre os resultados apresentados nos capítulos anteriores.

1.2 JUSTIFICATIVA

1.2.1 BIOAEROSSÓIS

Aerossóis biológicos primários, ou simplesmente bioaerossóis, são um conjunto de partículas atmosféricas biogênicas. Este termo engloba uma grande gama de partículas de diversas origens. Aeromicrobiologia é uma área de pesquisa interdisciplinar e secular. Charles Darwin no século XIX enquanto navegava no Oceano Atlântico identificou esporos em tempestades de poeira originadas no Saara (DARWIN, 1846). Pasteur, também no século XIX realizou ensaios laboratoriais com o objetivo de analisar a presença e a variação de microrganismos na atmosfera (ARIATTI; COMTOIS, 1993).

Mesmo com estudos pioneiros datando há mais de 180 anos, aeromicrobiologia ainda se trata de uma área de estudo em pleno desenvolvimento. Nas últimas décadas o avanço das técnicas de análise moleculares contribuiu para o avanço desta área, que atualmente se encontra em fase aperfeiçoamento de métodos para coleta e análise (BURROWS et al., 2009; LUHUNG et al., 2015).

Em contraste aos ambientes naturais, há um maior número de estudos disponíveis sobre análise de bioaerossóis bacterianos em ambientes internos e ambientes urbanos. Estes estudos focam principalmente na detecção, quantificação e identificação de bioaerossóis contendo agentes microbianos patogênicos (POLYMENAKOU, 2012; XU et al., 2011; FUJIYOSHI; TANAKA; MARUYAMA, 2017).

Para Burrows et al. (2009) a aerobiologia é um campo ainda caracterizado por uma notável falta de conhecimento e uma abundância de especulação. Nesta revisão o autor afirma que poucas observações foram publicadas, e a falta de uma metodologia padronizada e moderna dificulta a interpretação e a comparação dos resultados. Grande parte da especulação se concentrou em interações potenciais entre as bactérias atmosféricas e os sistemas biogeoquímicos da Terra.

Alguns estudos indicam que os bioaerossóis são elementos centrais no desenvolvimento, evolução e dinâmica dos ecossistemas. Desempenham um papel fundamental na dispersão de unidades reprodutivas de plantas e microrganismos (pólen, esporos etc.) (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016). Hipóteses sugerem que a presença de bactérias na atmosfera pode impactar a formação de nuvens, agindo como núcleos de condensação de partículas, com possíveis implicações para o clima global (BURROWS et al., 2009).

Pesquisas constataram que os aerossóis biológicos primários liberados das superfícies terrestre e oceânica podem ser levados a grandes altitudes e transportado por longas distâncias, podendo até serem transportados entre os continentes terrestres, como é o caso da poeira do deserto do Saara que atravessa o oceano atlântico e é depositado na bacia amazônica (DELEON-RODRIGUEZ et al., 2013; SMITH et al., 2013; MAKI et al., 2013; YU HONGBIN et al., 2015; WU et al., 2019).

1.2.2 OBSERVATÓRIO DA TORRE ALTA DA AMAZÔNIA (ATTO)

Compreendendo a importância do bioma Amazônia para as dinâmicas terrestres e para evitar danos irreversíveis a esse complexo sistema, precisamos entender melhor as interações entre a biosfera e a atmosfera nessa importante região. Em vista do fato de que a Amazônia e seu ambiente global estão mudando rapidamente devido ao Antropoceno, observações contínuas são essenciais para acompanhar essas mudanças. É particularmente urgente obter dados de referência agora, para documentar as atuais condições atmosféricas e ecológicas (CRUTZEN; STOERMER, 2000; CRUTZEN, 2002; FERNANDEZ, 2011; ANDREAE et al., 2015).

O Observatório da Torre Alta da Amazônia (ATTO) foi iniciado em 2008 como uma parceria internacional entre o Brasil e a Alemanha com o objetivo de produzir conhecimento sobre as dinâmicas climáticas da região. Para investigações micrometeorológicas, torres fornecem a capacidade única de obter medições contínuas em uma série de alturas (ANDREAE et al., 2015).

Foi identificado um local a 150 km a nordeste de Manaus, pelos seguintes critérios: (1) mínima perturbação humana, mas com possíveis mudanças futuras no uso da terra em larga escala; (2) topografia relativamente plana, sem grandes áreas úmidas próximo a região, (3) propriedade de terra estável, protegida e acesso controlado, e (4) a possibilidade de chegar ao local em um tempo razoável para facilitar a pesquisa e atividades educacionais. Em 2008 foram montadas duas torres de medição de altura intermediária (80 m) e em 2015 foi inaugurada a torre ATTO com 325 metro de altura (ANDREAE et al., 2015).

Nesta primeira década do Observatório foram realizados diversos tipos de estudos envolvendo aerossóis, entre estes, estudos relacionados a bioaerossóis. Entretanto a presente pesquisa inova ao investigar o microbioma de organismos

procarióticos cultiváveis e não cultiváveis através de análises de perfil proteico, genômicas e metagenômicas.

1.3 OBJETIVOS

Estabelecer um primeiro inventário da microbiota de bioaerossóis procarióticos cultiváveis e não cultiváveis na Estação Científica do Uatumã, Amazonas.

1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a biodiversidade de bioaerossóis bacterianos cultiváveis por análise de espectrometria de massas e sequenciamento do gene rDNA 16S;
- Determinar a biodiversidade de bioaerossóis bacterianos cultivável e não-cultivável por análise metagenômica de sequenciamento do gene rDNA 16S.

1.4 REVISÃO DE LITERATURA

1.4.1 BIODIVERSIDADE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Segundo a Convenção da Diversidade Biológica (1992), biodiversidade ou diversidade biológica é definida como:

“a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas”.

Para o Ministério do Meio Ambiente (2019) a variedade de biomas reflete a enorme riqueza da flora e da fauna brasileiras e o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta. Correspondendo a mais de 20% do número total de espécies da Terra, eleva o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países mega diversos.

Para Joly et al., (2011) a ciência da biodiversidade é amplamente reconhecida como área prioritária de investigação científica. O autor classifica a área de pesquisa no Brasil, em três principais vertentes: 1) descoberta e caracterização da biodiversidade - sistemática e taxonomia; 2) compreensão do funcionamento de ecossistemas e serviços ambientais; e 3) bioprospecção da quimiodiversidade da biota brasileira.

A ciência da biodiversidade é relevante para diversos setores e atividades, e tem sido utilizado no avanço da biologia da conservação, no desenvolvimento de mecanismos que viabilizem o uso sustentável do patrimônio natural. Esta área de estudo inclui o descobrimento/descrição de novas espécies e/ou interações, estudos do processo evolutivo e dos processos ecológicos, juntamente com estudos focados nos serviços ambientais, no valor socioeconômico e cultural da biodiversidade, além da definição de mecanismos e estratégias para sua conservação e uso sustentável (JOLY et al., 2011).

A biodiversidade pode se tornar uma grande vantagem na busca pelo desenvolvimento nacional, se utilizada de maneira adequada e sustentável. Segundo o N. Junior (2011) a bioprospecção pode ser definida como “a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, que possam ter um potencial econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto”.

Historicamente a sociedade se beneficia direta e indiretamente de grandes descobertas biotecnológicas em diversos setores como: na saúde, agricultura, nutrição, indústria farmacêutica e de cosméticos, biorremediação, biomonitoramento, combustíveis, energia, entre outros (JUNIOR, 2011).

No Brasil primeiras descobertas de bioprodutos da biodiversidade datam de 1533, pouco depois da chegada dos portugueses, os invasores, na busca por especiarias e produtos de valor para exploração econômica, descobriram a *Caesalpinia echinata*, o pau-brasil, uma fonte de corante vermelho (brasilina, brasilidina) valiosa, o primeiro exemplo de produtos naturais de valor agregado (BOLZANI, 2016). O veneno de jararaca (*Jathropus jararaca*) por exemplo, de onde foi isolado princípios a fim de produzir um anti-hipertensivo e o anti-inflamatório de uso tópico Acheflan, uma inovação brasileira obtida de *Cordia verbenácea*, um arbusto nativo da Mata Atlântica (BARREIRO, 2009).

No Brasil, algumas políticas públicas alinhadas com as discussões da Convenção da Diversidade Biológica, foram desenvolvidas para a proteção e conservação da biodiversidade nacional, como é o caso da Política Nacional da Biodiversidade (Decreto 4.339/2002) que tem como objetivo geral a promoção, de forma integrada, da conservação da biodiversidade e da utilização sustentável de seus componentes, com a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos, de componentes do patrimônio genético e dos conhecimentos tradicionais associados a esses recursos.

A PNBio define como objetivo específico o conhecimento da biodiversidade e congrega diretrizes voltadas à geração, sistematização e disponibilização de informações que permitam conhecer os componentes da biodiversidade do país e que apoiem a gestão da biodiversidade, bem como diretrizes relacionadas à produção de inventários e à realização de pesquisas ecológicas.

Outra política pública que dialoga com o tema é a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, cujo objetivo é promover e executar ações com vistas ao estabelecimento de ambiente adequado para o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos inovadores.

Segundo Junior (2011, p. 29):

“Desenvolvendo internamente a pesquisa, o patenteamento, a produção e a exportação de produtos, a biodiversidade é aproveitada ao mesmo tempo que a maior parte do benefício econômico permanece no país. O processo que vai da identificação de um componente biológico de uso potencial a um produto comercial é complexo, envolve muitas etapas e é tipicamente longo, custoso e arriscado, geralmente requerendo muita tecnologia e pessoal altamente qualificado para pesquisa. Por esses motivos, as políticas públicas relacionadas à inovação e formação de recursos humanos têm um papel essencial no fomento à bioprospecção, a fim de que o próprio país possa ser protagonista e não apenas um mero fornecedor de recursos para a pesquisa de terceiros (...). Especialmente no caso do Brasil, a bioprospecção pode associar conservação ambiental, geração de renda e redução das desigualdades regionais. O aporte do capital privado e o estímulo a atividades de P&D nos locais em que se encontram os grandes repositórios de recursos genéticos são os principais requisitos (...). Integrar efetivamente a preocupação com o potencial da bioprospecção às políticas de inovação e de desenvolvimento industrial e regional é primordial para alterar essa situação. Essa integração deve facilitar investimentos na atividade, principalmente em regiões com grande concentração de recursos genéticos e menos desenvolvidas economicamente. Só assim o Brasil poderá realizar o potencial de seus recursos genéticos e permitir que a bioprospecção auxilie na busca pelo desenvolvimento sustentável.”

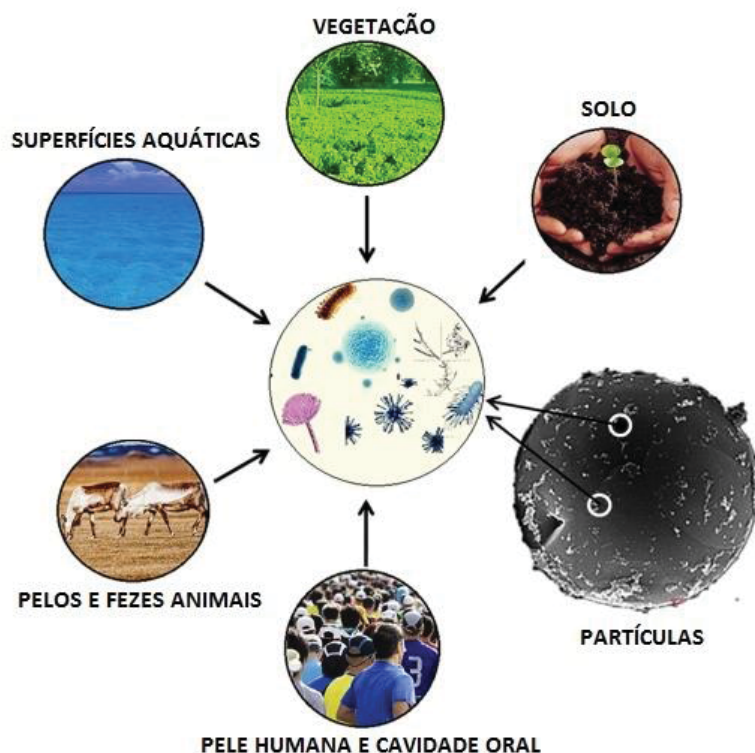
1.4.2 BIOAEROSSÓIS

Bioaerossóis é um assunto multidisciplinar, que envolve diferentes campos de pesquisas tais como: microbiologia, bioquímica, engenharias, poluição do ar, saúde pública, epidemiologia, ecologia, física, nanotecnologia, entre outras áreas (YAO, 2018).

Microrganismos são onipresentes no ambiente atmosférico, bioaerossóis são partículas geralmente associadas a compostos de origem biológica, de fonte natural ou antrópica, correspondendo a uma das classes das partículas atmosféricas. Esta definição inclui todos os fungos e bactérias patogênicas e não patogênicas, viáveis e não viáveis, vírus, pólenes, algas, entre outros. Variam em tamanho e composição, são altamente complexos e ubíquos (GHOSH; LAL; SRIVASTAVA, 2015; FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016; ZHAI et al., 2018).

A atmosfera é considerada como um dos habitats para a microrganismos aéreos ou bioaerossóis, originados do solo, vegetação e superfícies aquáticas como rios, baías e oceanos, entre outras fontes (FIGURA 1). A atmosfera possui alta complexidade e variação entre os ambientes e ecossistemas, alguns fatores são essenciais ou limitantes para a presença e desenvolvimento de comunidades microbiológicas, como alta taxa de radiação solar, baixa umidade, baixa concentração de nutrientes e grande capacidade de dispersão (ZHAI et al., 2018).

FIGURA 1 – FONTES DE BIOAEROSSÓIS

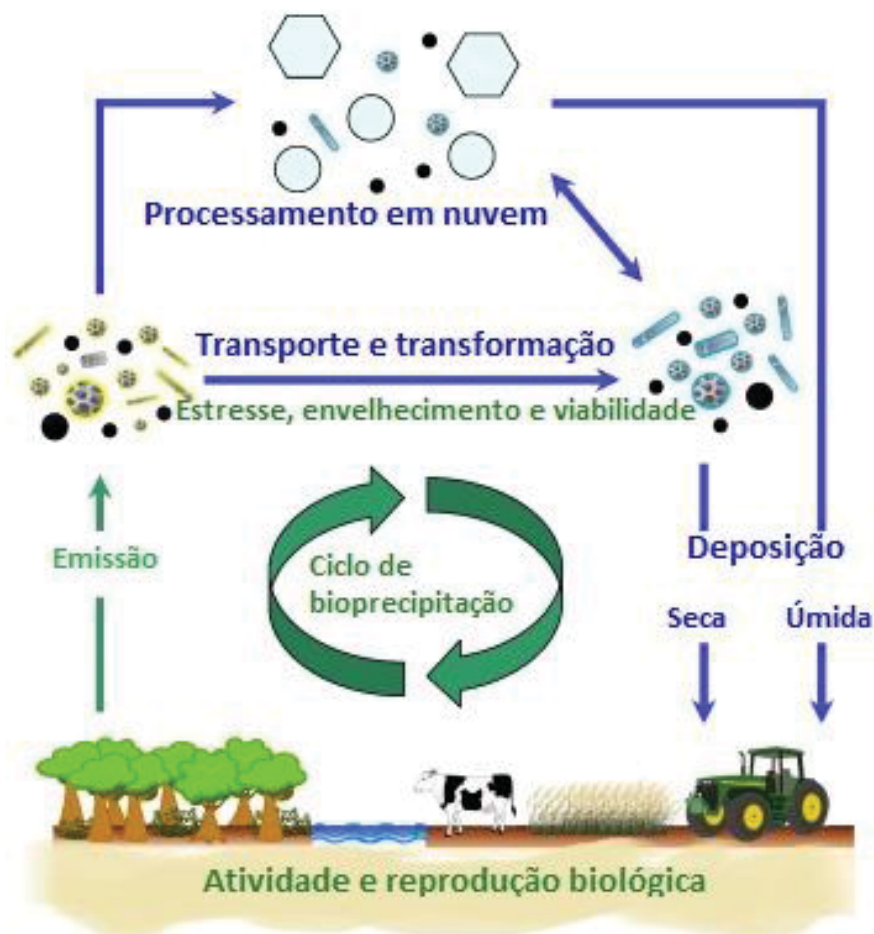


FONTE: Adaptado de ZHAI et al., 2018. Tradução nossa.

As dimensões aerodinâmicas de cada partícula de aerossóis possuem relação direta com o tempo de permanência e dispersão do bioaerosol na atmosfera. Partículas com massa e diâmetro maiores possuem maior potencial de sedimentação por ação da gravidade. A dinâmica dos bioaerossóis também é reciprocamente influenciada pelo ciclo hidrológico na atmosfera uma vez que a precipitação de chuva ou neve pode levar a remoção de aerossóis atmosféricos. Esse processo de “deposição úmida” é o maior sumidouro aerossóis atmosféricos. Outro meio é conhecido como “deposição a seco” por sedimentação das partículas através da ação da gravidade e/ou difusão (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016).

Dependendo das propriedades do aerossol e das condições meteorológicas, os tempos de residência característicos (vidas úteis) das partículas de aerossóis na atmosfera variam de horas a semanas. Após retornar ao solo, os bioaerossóis viáveis podem continuar a reprodução biológica e a atividade metabólica que pode gerar ainda mais emissão de partículas, fechando assim um ciclo de retroalimentação conforme é possível observar na FIGURA 2 (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016; SUNI et al., 2015; MORRIS et al., 2014).

FIGURA 2 – CICLO DE BIOPRECIPITAÇÃO



FONTE: Adaptado de FRÖHLICH-NOWOISKY et al, (2016). Tradução nossa.

LEGENDA: A figura ilustra o ciclo de bioprecipitação, de emissão/deposição de bioaerossóis, além dos processos de nucleação, estresse, envelhecimento viabilidade/inviabilidade dos bioaerossóis na atmosfera

Pesquisas constataram que os aerossóis biológicos primários liberados das superfícies terrestre e oceânica podem ser levados a grandes altitudes e transportado por longas distâncias, podendo até serem transportados entre os continentes terrestres (DELEON-RODRIGUEZ et al., 2013; SMITH et al., 2013; MAKI et al., 2013; YU HONGBIN et al., 2015).

Existe uma relação íntima entre a presença de bioaerossóis microbiológicos viáveis e outros tipos de aerossóis, onde os aerossóis são portadores de bioaerossóis viáveis por adesão, uma maneira de estabelecer a comunidade e sustentar a vida de microrganismos em um habitat específico. Além do fato que os aerossóis podem oferecer nutrientes ao microrganismo, servem também “escudo” de redução de danos pela radiação ultravioleta (KHARANGATE-LAD, 2015; MAIER; GENTRY, 2015; ZHAI et al., 2018).

Algumas espécies são patogênicas e podem causar doenças humanas, vegetais e animais, enquanto outras são benéficas para a saúde humana e o ambiente. Os bioaerossóis desempenham um papel fundamental na dispersão de unidades reprodutivas de plantas e micróbios (pólen, esporos etc.), para os quais a atmosfera permite o transporte sobre barreiras geográficas e longas distâncias, sendo, portanto, altamente relevantes para a disseminação de organismos, permitindo a troca genética entre habitats. Eles são elementos centrais no desenvolvimento, evolução e dinâmica dos ecossistemas (PRUSSIN; GARCIA; MARR, 2015).

A dispersão de agentes patogênicos e alérgenos vegetais, animais e humanos têm implicações importantes na agricultura e saúde pública, além dos potenciais impactos da transmissão pela atmosfera de organismos geneticamente modificados. Além disso, os bioaerossóis podem servir como núcleos para condensação vapor de água e de cristais de gelo, influenciando assim o ciclo hidrológico e o clima (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016; BRODIE et al., 2007; DESPRÉS et al., 2007; FOLLONI et al., 2012; TOBO YUTAKA et al., 2013).

Na maioria dos ambientes terrestres, os bioaerossóis constituem uma fração substancial da carga atmosférica de aerossóis. Com relação ao número e à concentração de massa na faixa de tamanho de partícula grossa com diâmetros maiores que 1 μm , os bioaerossóis normalmente respondem por cerca de 30% da massa de aerossóis no ar urbano e rural e até 80% em da floresta tropical (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016). No geral, o papel dos bioaerossóis na atmosfera e sua interação com os ecossistemas terrestres e marinhos não são bem descritos e compreendidos, nem para o estado atual do sistema terrestre e do clima, nem com relação à evolução passada e a mudanças futuras (SOLOMON et al., 2007; STOCKER et al., 2013).

Ainda não é compreendido como as mudanças globais e regionais em curso no uso da terra, clima e biodiversidade afetarão a abundância e as propriedades dos bioaerossóis atmosféricos que podem influenciar a disseminação da vegetação, fungos e microrganismos. As mudanças globais podem alterar o padrão de dispersão de patógenos vegetais e animais através da atmosfera. Além disso, alterações na distribuição atmosférica de bioaerossóis podem alterar padrões espaciais e temporais de precipitação, afetando o clima e o ciclo hidrológico. (MORRIS et al., 2014; PÖSCHL; SHIRAIWA, 2015; WILLIAMS; CRUTZEN, 2013). Esta falta de conhecimento é particularmente grave no que diz respeito à avaliação, previsão e

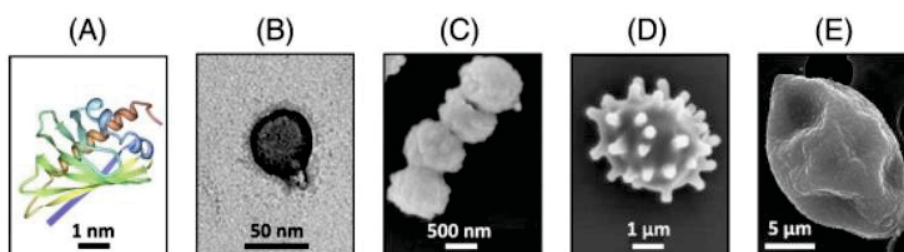
gestão das mudanças ambientais do Antropoceno, conforme estabelecido por Paul Crutzen (CRUTZEN; STOERMER, 2000; CRUTZEN, 2002).

1.4.3 BIOAEROSSÓIS BACTERIANOS

Uma célula bacteriana única geralmente é menor do que outros tipos de aerossóis. Porém, a adesão de outros aerossóis não bióticos ou mesmo de outros aerossóis biológicos, podem aumentar o tamanho das partículas de bioaerossóis (FIGURA 3). Comparado bioaerossóis ligados à aerossóis por adesão, com bioaerossóis isolados que transitam pela atmosfera, os indivíduos que não possuem adesão com outro tipo de aerossóis terão maior probabilidade de se tornarem inviáveis. Bioaerossóis anexados a partículas gradualmente formam comunidades abundantes e mutáveis, com numerosas espécies microbianas onde diferentes partes de cada constituinte microbiano geram diversidade microbiológica (ZHAI et al., 2018). (LIGHTHART, 2000).

Bactérias, em geral, têm tamanhos variando de 0,1 a 5µm, e cada bactéria tem característica de forma particular que desempenha um papel importante na adesão nos aerossóis (DELEON-RODRIGUEZ et al., 2013). Com tamanho menor, as bactérias são mais fáceis de anexar a partículas finas como o PM_{2.5} e até mesmo partículas menores. O tamanho de partícula é um fator essencial para determinar a capacidade dos aerossóis de ser inalável e afetar a saúde humana. Assim, a distribuição de tamanho de bioaerossóis é um indicador da avaliação de risco à saúde por patógenos ou alérgenos transportados pelo ar (KAWANAKA et al., 2009).

FIGURA – 3 ESCALAS DE TAMANHOS CARACTERÍSTICOS DE PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS



FONTE: Adaptado de FRÖHLICH-NOWOISKY et al. (2016)

LEGENDA: Bioaerossóis com ilustrações exemplares: (A) Proteína, (B) Vírus, (C) Bactérias, (D) Esporos fúngicos e (E) Grãos de pólen.

Alguns pesquisadores acreditam que a atmosfera não somente serve como meio de dispersão de microrganismos, mas também como um ambiente onde estes microrganismos podem estar metabolicamente ativos e se multiplicando. A composição de espécies bacterianas sobre o aerossol é uma parte vital para os pesquisadores descobrirem as fontes potenciais de microrganismos por análise de componentes principais, espécies dominantes e análise da trajetória reversa da massa de ar (LEE et al., 2007; SEIFRIED et al., 2015).

Em ambientes florestais, estudos recentes avaliam bactérias que possuem como características o auxílio ao crescimento de plantas, são denominados “PGPT” (*Plant Growth-Promoting Traits*) e incluem habilidades de promover direta ou indiretamente o crescimento de plantas através da síntese de substâncias que melhoram seu crescimento ou auxiliando na aquisição de nutrientes do ambiente circundante (por exemplo, fixação de nitrogênio e sequestro de ferro) (GLICK, 2012; STRILUK et al., 2017; RIZZOLO et al., 2017).

1.4.4 O BIOMA AMAZONIA E ASPECTOS BIOCLIMÁTICOS

A variedade de espécies na Bacia Amazônica está diretamente relacionada à variedade de habitats, o bioma contém os ecossistemas terrestres e de água doce mais ricos em espécies do planeta (HOORN et al., 2010; WITTMANN et al., 2013; ANDREAE et al., 2015).

A região é constituída por mais de 600 diferentes tipos de habitat terrestre e de água doce. Com toda essa diversidade de ambientes e extensão, a Amazônia ainda é uma fronteira do conhecimento, com espécies novas sendo descobertas a cada ano. Entre 1999 e 2009, por exemplo, mais de 1.200 espécies foram descobertas por cientistas na região. Entre elas, estão 639 plantas, 257 peixes, 216 anfíbios, 55 répteis, 39 mamíferos e 16 aves (WWF, 2010; MMA, 2010; MMA, 2019).

Estima-se que o bioma abriga pelo menos 40 000 espécies de plantas, mais de 400 espécies de mamíferos, cerca de 1300 espécies de aves e um número incontável de espécies de invertebrados e microrganismos, em sua maior parte ainda não conhecidos e catalogados (SILVA; RYLANDS; FONSECA, 2005)

Segundo Ter Steege et al. (2013), um único hectare da floresta pode ser o lar de mais de 100 espécies de árvores diferentes. A estimativa atual é de cerca de

16.000 espécies de árvores. O estudo ainda calculou a densidade média de árvores por hectares, chegando à estimativa de 565 árvores/ha. Surpreendentemente, um número relativamente pequeno (227 espécies, ou 1,4%) é responsável por metade de todas as árvores individuais, que representam uma grande fração dos serviços ecossistêmicos da Amazônia. Fato este, relevante para a pesquisa e compreensão da biogeoquímica amazônica, por exemplo, estudos sobre as trocas gasosas entre plantas e a atmosfera (ANDREAE et al., 2015).

A atmosfera amazônica é composta por uma grande diversidade de gases, aerossóis, de origem biogênica e antropogênica, com dinâmicas e processos ainda pouco compreendidos. Estudos indicam que de modo geral, a atmosfera da Amazônia central apresenta sazonalidade entre uma estação úmida, predominantemente limpa (normalmente de fevereiro a maio) e uma estação seca, substancialmente poluída (normalmente de agosto a novembro) com períodos de transição correspondentes entre elas (MARTIN et al., 2010a; ANDREAE et al., 2015; MORAN-ZULOAGA et al., 2018).

Esta variância entre período chuvoso e de seca é determinada pela proximidade do bioma à Zona de Convergência Intertropical (ZCIT), pela correspondente circulação de vento alísios e pela forte sazonalidade da emissão de aerossóis na África e na América do Sul (MORAN-ZULOAGA et al., 2018; WU et al., 2019).

Na região amazônica, os bioaerossóis são compostos por uma complexa, diversa e variável mistura de partículas emitidas distintas origens, que incluem: os ecossistemas da floresta tropical, poeira de longa distância transportada do deserto do Saara, aerossóis marinhos do Oceano Atlântico e partículas grosseiras de fumaça de incêndios de desmatamento. (MARTIN et al., 2010a, b; FUCHS; CERMAK, 2015; ABDELKADER et al., 2017; MORAN-ZULOAGA et al., 2018).

Segundo Para Moran-Zuloaga et al., (2018), no ATTO, primariamente, o ciclo de vida dos aerossóis é definido pela emissão e transporte de aerossóis naturais (isto é, poeira do deserto, maresia e bioaerossóis primários), que são liberados e dispersos em diferentes escalas espaço-temporais. As partículas de aerossóis do Saara são consideradas fertilizantes importantes para os solos amazônicos comparativamente pobres contribuindo para o acréscimo da carga de ferro, sulfato de amônio e fósforo, por exemplo (SWAP et al., 1992; RIZZOLO et al., 2017; MORAN-ZULOAGA et al., 2018; WU et al., 2019).

Em um estudo realizado no ATTO em 2012 com amostras coletadas com ponto de corte para os diâmetros das partículas, observaram uma predominância de (46%) de bioaerossóis, ou partículas orgânicas primárias, em amostras com a fração PM_{2-4} μm . Já em aerossóis submicrômetros $PM_{0.25-0.5}$ μm foi identificada predominância combinada de aerossóis orgânicos secundários e sulfato de amônio. E para as partículas supermicrômetras PM_{1-2} μm foi identificado a prevalência sal mineral envelhecido e sal marinho, aerossóis orgânicos secundários e sulfato de amônio (WU et al., 2019).

1.4.5 MICROBIOMAS

Um microbioma é a comunidade ecológica de microrganismos compartilha determinado espaço, corpo ou ambiente. Aguilera et al. (2018) enumeraram os vários desafios particulares no caso do microbioma atmosférico: (1) biomassa muito baixa; (2) métodos de amostragem ineficientes; (3) falta de protocolos padrão; (4) a composição de micróbios transportados pelo ar muda continuamente devido a padrões meteorológicos, espaciais e temporais; e (5) evitar a presença de DNA desconhecidos no sistema.

Apesar da taxa relativamente baixa de cultivo de microrganismos em laboratório, a análise de microrganismos cultiváveis é considerada estratégica para o desenvolvimento de estudos sobre microbiomas. O cultivo, aliado às técnicas de análise moleculares como as análises proteômica e genômica, podem fornecer informações extremamente relevantes, tal como: espécies dominantes, descoberta de novas espécies, e até as dinâmicas e relações destes microrganismos com os ciclos biogeoquímicos, além do fato que facilita bioprospecção de atividades de interesse, produção de enzimas, antibióticos, metabólitos diversos, entre muitas outras informações (ULTEE et al., 2004; WADE, 2002; AMANN et al., 1990; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

Amostras ambientais coletadas para estudos de biodiversidade de organismos cultiváveis por análises moleculares é um trabalho que demanda grande esforço laboratorial. Em muitos casos, assim como no presente estudo, envolvem grupos de pesquisa compostos com profissionais de diferentes formações.

1.4.6 ANÁLISE DE MASSAS PROTEICA POR MALDI-TOF MS

A técnica MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight - mass spectrometer*) é uma técnica utilizada para a determinação de massas moleculares. De uma forma geral, a espectrometria de massas baseia-se em propriedades físicas do analito de forma a determinar a relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD et al., 2003; ASSIS et al., 2011).

Para a dessorção, a amostra é revestida por uma matriz ácida a qual fornece um próton para o processo de ionização. A dessorção da amostra é ocasionada por um laser que realiza centenas de disparos para que ela seja conduzida pelo tubo de voo, dentro do equipamento, conforme é ilustrado na FIGURA 4-C. A sigla TOF (*Time of Flight*) caracteriza o tempo de voo da amostra ionizada em um tubo de vácuo até que esta atinja o detector (TANAKA et al., 1988). Em resumo, uma vez ionizada e dessorvida, a amostra é acelerada por um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo, separada em função da sua massa molecular e sua carga e assim, tem-se a medida da relação massa/carga (ASSIS et al., 2011).

As proteínas são moléculas que desempenham distintas funções celulares, sendo capazes de orquestrar expressão de genes, catalisar reações metabólicas, além de compor a parte estrutural da célula (EMIDIO et al., 2015). A identificação microbiana por MALDI-TOF MS é baseada na avaliação de proteínas ribossômicas, que são comumente abundantes na célula (RYZHOV et al., 2001; ASSIS et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

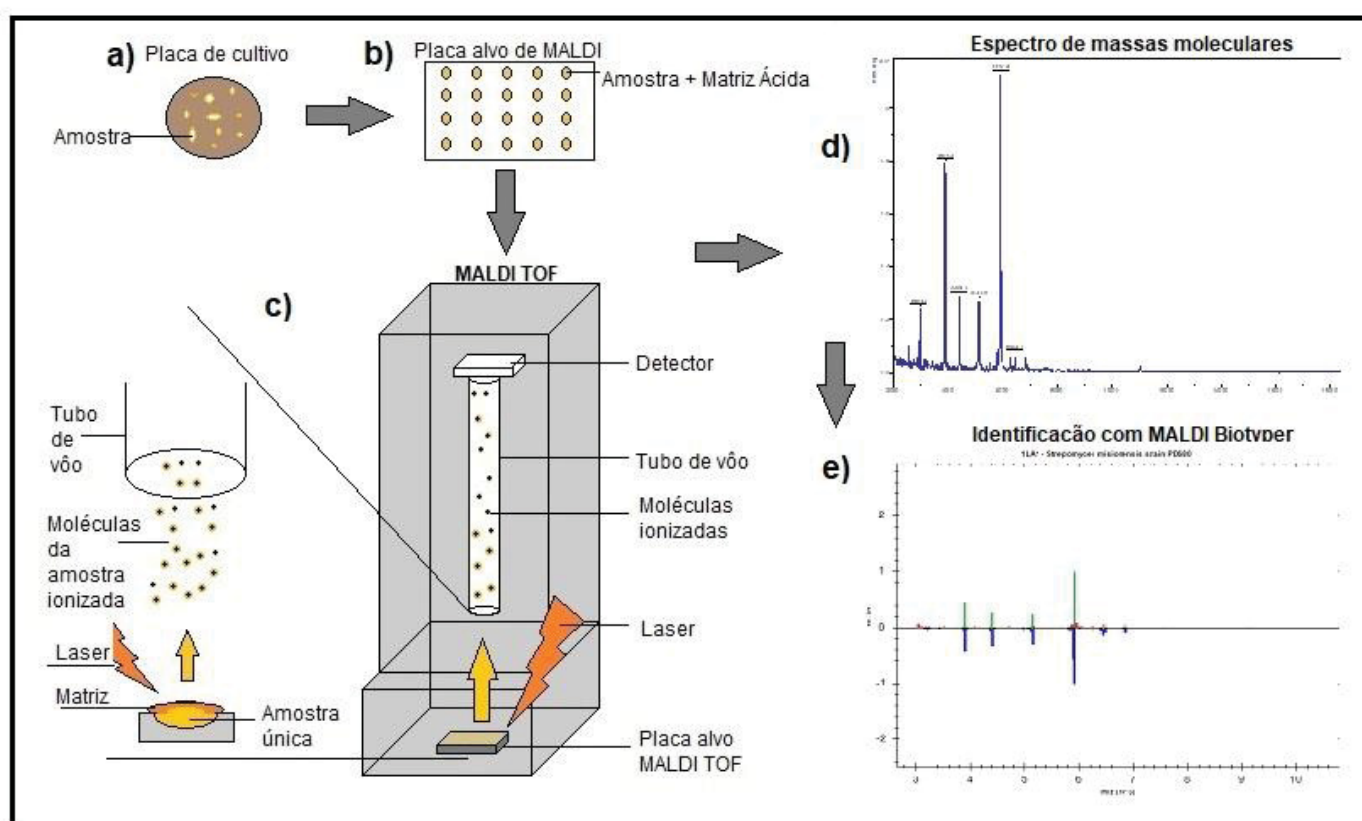
Para identificação, cada perfil proteico gerado pelas análises das amostras em MALDI-TOF, é comparada com perfil dos espectros de referência, denominados MSP (*Main Spectra Projections*), presentes na biblioteca IVD (*In Vitro Diagnostic System, Bruker Daltonics*) integrada, por meio do algoritmo *Biotyper* (FIGURA 4-D). Nesse processamento, realiza-se a correspondência de padrões de picos, utilizando a posição, as distribuições de intensidade e a frequência de picos, atribuindo-se os escores de classificação sem qualquer intervenção do utilizador (GOULART, RESENDE, 2013; MELO, 2014; BIER et al., 2017)

Os perfis proteicos, conhecidos também como impressão digital (*fingerprint*) do analito, gerados a partir da análise em MALDI-TOF MS são variados entre microrganismos e entre os compostos detectados no espectro. Alguns picos (massas moleculares) são específicos para o gênero, espécie, e por vezes a subespécies

possibilitando a identificação de organismos por similaridade dos perfis proteicos, conforme é ilustrado na FIGURA 4-E (CARBONELLE et al., 2011).

Os avanços das técnicas de análises moleculares também estão sendo utilizados para estudos atmosféricos, é possível encontrar na literatura estudos que utilizaram MALDI-TOF para identificação da biodiversidade de bioaerossóis cultiváveis (JEONG et al., 2014; JACKSON; MISHRA; MURRAY, 2004; SETLHARE et al., 2014; FYKSE et al., 2015; MADSEN et al., 2015; LIANG et al., 2015).

FIGURA 4 – ILUSTRAÇÃO DAS ETAPAS PARA IDENTIFICAÇÃO POR MALDI TOF E BIOTYPER



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Ilustração dos passos para identificação de microrganismos por MALDI TOF e *Biotyper*.

- Ilustra o cultivo das amostras em placa de Petri com meio de cultura.
- Representa a placa alvo, onde as amostras são inseridas individualmente e recobertas pela solução com a matriz.
- Representa o modo como o equipamento opera, com a incidência do laser sobre a amostra revestida pela matriz ácida, promovendo a dessorção do analito para que as moléculas decole para o tubo de voo em direção ao detector que fará o reconhecimento da relação m/z das moléculas.
- Representa um exemplo de espectro proteico gerado pela análise em MALDI TOF.
- Ilustra a identificação das amostras por similaridade do perfil proteico de microrganismos já conhecidos pelo software *MALDI Biotyper*.

1.4.7 PCR E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rDNA

Nas últimas décadas, técnicas usadas para estudar microrganismos no meio ambiente se expandiram drasticamente devido à capacidade de detectar e identificá-los por meio de comparação de sequências de DNA ou RNA. A reação em cadeia de polimerase (PCR) com o sequenciamento do gene 16S rDNA é um dos métodos mais utilizados para estudos de microbiota (PACE, 1997; CHERKAOUI et al., 2010; SANDRIN, GOLDSTEIN, SCHUMAKER, 2012; SAMBO et al., 2017).

As vantagens das técnicas baseadas em PCR para aerossóis incluem a sensibilidade notável e a detecção e identificação inequívocas do bioaerosol que podem ser feitas independentemente da cultura utilizada. O método de PCR é geral, pois pode ser aplicado a qualquer material biológico de organismos eucarióticos e procarióticos que contenha ácidos nucleicos (PECCIA; HERNANDEZ, 2006).

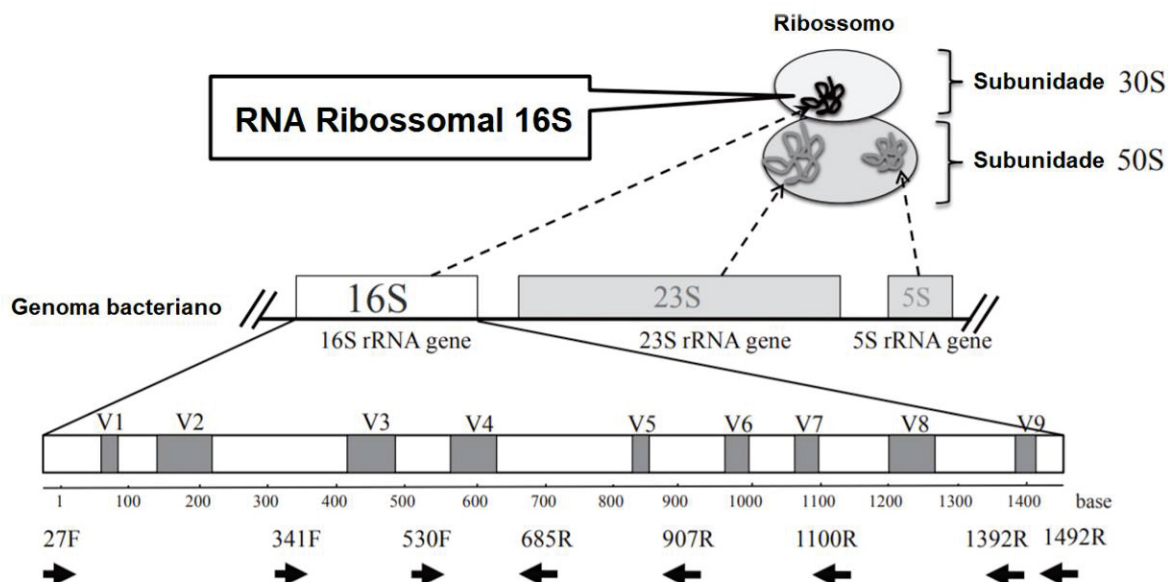
A reação em cadeia da polimerase (PCR), uma reação enzimática na qual uma sequência de DNA (geralmente um gene específico ou porção de um gene) é selecionada e replicada (PECCIA; HERNANDEZ, 2006). O gene 16S do RNA ribossomal (16S rDNA) é o gene alvo mais popular em muitos métodos moleculares para identificação de procarióticos. O ribossomo é composto de dois componentes principais: a subunidade ribossômica pequena (subunidade 30S ribossômica em células procarióticas) e a subunidade grande (subunidade ribossômica 50S em células procarióticas) conforme é possível observar na figura a seguir (FUKUDA et al., 2016).

Cada subunidade contém uma ou mais moléculas de RNA ribossômico (produzido a partir de um rDNA) e uma variedade de proteínas ribossômicas. O gene 16S rDNA codifica uma molécula de RNA ribossômico da subunidade ribossômica 30S presente em todas as células procarióticas. Os rDNA 23S e o 5S são as subunidades rDNA contidas na subunidade ribossômica 50S. Os genes que codificam os componentes do ribossomo têm sido mais conservados, o que significa que suas estruturas mudaram muito pouco ao longo da história evolutiva devido à sua importante função. Os genes ribossomais são usados como “genes de manutenção”. (FUKUDA et al., 2016)

O gene 16S rDNA é uma ferramenta comumente usada para identificar bactérias por vários motivos. Primeiro, o gene é relativamente curto (aproximadamente 1.500 pares de base). Em segundo lugar, existem dez regiões na sequência do gene 16S rDNA que são comuns entre a maioria das bactérias (região

conservada) e são separadas em nove regiões diferentes (regiões hipervariáveis) (FUKUDA et al., 2016)

FIGURA 5 -- O ESQUEMA DO COMPLEXO RIBOSSOMAL E O GENE rDNA 16S



FONTE: Traduzido de FUKUDA et al., 2016.

LEGENDA: As caixas branca e cinza indicam regiões conservadas e regiões hipervariáveis, respectivamente. As setas em negrito são mostradas posições aproximadas de primers universais na sequência do gene rDNA 16S de *Escherichia coli*. Em branco: regiões conservadas, em cinza: regiões hipervariáveis (V1-V9).

Através da reação de PCR, utilizando *primers* de DNA cuidadosamente projetados, uma sequência genética de um microrganismo específico é amplificada sendo depois sequenciada. As sequências resultantes podem então ser analisadas diretamente e comparadas com bancos de dados públicos existentes para identificação (PECCIA; HERNANDEZ, 2006).

A obtenção de afiliação de espécies por este método é bastante dispendiosa e, acima de tudo, demorada, uma vez que as sequências a serem comparadas em bancos de dados de referência são obtidas por extração de DNA, amplificação e sequenciamento de alvos específicos. Assim, a identificação/classificação de novos isolados não é imediata e os requisitos de custo e carga de trabalho para a tecnologia, atualmente impedem seu uso rotineiro em cada isolado. (CHERKAOUI et al., 2010)

A amplificação de fragmentos cobrindo regiões V1 – V4 (FIGURA 5) totais ou parciais é favorecida para estudar comunidades bacterianas na atmosfera. O

protocolo para é para o sequenciamento da região do 16S é padrão utilizado pelo laboratório de análise onde as amostras foram sequenciadas, e também pelo *Earth Microbiome Project* (EMP, 2019) Alguns estudos dedicaram-se a investigar o microbioma atmosférico em ambientes externos através de sequenciamento metagenômico (NUÑEZ et al., 2016; YOOSEPH et al., 2013; MAKI et al., 2017; SMITH et al., 2018; SERRANO-SILVA; CALDERÓN-EZQUERRO, 2018; DEGOIS et al., 2017; GONDOLFI et al., 2013; GONDOLFI et al., 2015; LUHUNG et al., 2015; MADSEN et al., 2015).

1.4.8 SEQUENCIAMENTO METAGENÔMICO

A técnica conhecida como sequenciamento metagenômico possibilita a análise molecular de comunidades microbianas independente de cultivo. É definida como o processo pelo qual o metagenoma é gerado a partir de extrações de amostras ambientais, envolve a amplificação e o sequenciamento do todo o material genético coletado em uma amostra (HOYLES; SWANN, 2019; BHARAGAVA et al., 2019).

Nos últimos anos, a metagenômica aumentou significativamente nosso conhecimento sobre a biodiversidade em diversos tipos de ambientes. Simplificando os passos necessários para investigar a microbiota, as atuais tecnologias de sequenciamento não estão restritas a bactérias, portanto, qualquer amostra biológica com uma mistura complexa de organismos pode ser analisada (NÚÑEZ et al., 2016).

Os avanços nos estudos baseados em metagenômica, feitos usando tecnologias de sequenciamento de última geração, permitiram uma impressionante exploração em grande escala da diversidade microbiana em uma variedade de ecossistemas, revelando tendências importantes na ecologia microbiana e na biogeografia, bem como na estrutura relações de funcionamento (NÚÑEZ et al., 2016, 2017; STALEY; SADOWSKY, 2018).

No entanto, o comprimento da fita de DNA sequenciada é atualmente restrita por tecnologias de sequenciamento e químicas existentes sendo limitada a algumas centenas de bases. A resolução taxonômica à qual as sequências podem ser classificadas com segurança normalmente são famílias e/ou gêneros (MIZRAHI-MAN et al., 2013; STALEY; SADOWSKY, 2018).

Idealmente, o gene completo deve ser sequenciado para obter atribuições taxonômicas precisas, uma vez que as diversas regiões hipervariáveis presentes nas subunidades mostram diferentes variabilidades, elas fornecem diferentes níveis de discriminação taxonômica. No entanto, a tendência atual é analisar o menor comprimento necessário para obter uma boa identificação taxonômica, reduzindo o custo da amostra e o tempo para análises bioinformáticas adicionais (LIU et al., 2008; GLENN, 2011; KIM, 2011).

A amplificação de fragmentos cobrindo regiões V1 – V4 (FIGURA 5) totais ou parciais é favorecida para estudar comunidades bacterianas na atmosfera. Este método é padrão utilizado pelo laboratório onde o sequenciamento foi realizado e também pelo *Earth Microbiome Project* (EMP, 2019).

Pesquisas anteriores dedicaram-se a investigar o microbioma atmosférico em ambientes externos através de sequenciamento metagenômico (NUÑEZ et al., 2016; YOOSEPH et al., 2013; MAKI et al., 2017; SMITH et al., 2018; SERRANO-SILVA; CALDERÓN-EZQUERRO, 2018; DEGOIS et al., 2017; GONDOLFI et al., 2013; GONDOLFI et al., 2015; LUHUNG et al., 2015; MADSEN et al., 2015).

Cientes da importância dos conhecimentos relacionados aos microbiomas, para compreender as dinâmicas dos ecossistemas, o presente estudo investigou o microbioma de bioaerossóis procarióticos através de análises moleculares, no sítio ATTO (*Amazon Tall Tower Observatory*), localizado na RDS do Uatumã, no estado do Amazonas.

Compreendendo que a região é considerada um dos biomas com maior porcentagem da biodiversidade do planeta e a importância do bioma Amazônico para as dinâmicas biogeoquímicas intercontinentais, este estudo, através de coletas *in loco* com amostradores atmosféricos localizados em diferentes alturas dentro do dossel da floresta Amazônica, vem fornecer informações inéditas sobre a biodiversidade do local.

REFERÊNCIAS

ABDELKADER, M.; METZGER, S.; STEIL, B.; et al. Sensitivity of transatlantic dust transport to chemical aging and related atmospheric processes. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 17, n. 6, p. 3799–3821, 2017. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/17/3799/2017/>>. Acesso em: 22/5/2019.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature01511>>. Acesso em: 23/5/2019.

AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; OLSON, R. J.; et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1919–25, 1990. American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2200342>>. Acesso em: 02/5/2019.

ANDREAE, M. O.; ACEVEDO, O. C.; ARAÚJO, A.; et al. The Amazon Tall Tower Observatory (ATTO): overview of pilot measurements on ecosystem ecology, meteorology, trace gases, and aerosols. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 15, n. 18, p. 10723–10776, 2015. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/15/10723/2015/>>. Acesso em: 23/5/2019.

ARIATTI, A.; COMTOIS, P. Louis Pasteur: the first experimental aerobiologist. **Aerobiologia**, v. 9, n. 1, p. 5–14, 1993. Kluwer Academic Publishers. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02311365>>. Acesso em: 23/5/2019.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA NA CLASSIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2011.92.344355>. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 344–355, 2011. Disponível em: <<http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/232>>. Acesso em: 23/5/2019.

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol32No3_679_11-QN09045.pdf>. Acessado em: 23/05/2019

BHARAGAVA, R. N.; PURCHASE, D.; SAXENA, G.; MULLA, S. I. Applications of Metagenomics in Microbial Bioremediation of Pollutants: From Genomics to Environmental Cleanup. **Microbial Diversity in the Genomic Era**, p. 459–477, 2019. Academic Press. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128148495000265>>. Acesso em: 3/6/2019.

BALMFORD, A.; BRUNER, A.; COOPER, P.; et al. Economic reasons for conserving wild nature. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5583, p. 950–3, 2002. American Association for the Advancement of Science. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169718>>. Acesso em: 23/5/2019.

BIER, Daniele et al. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de Salmonella spp. e Escherichia coli isolados de carcaças bovinas. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v. 37, n. 12, p. 1373-1379, Dec. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2017001201373&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 23/5/2019.

BOLZANI, V. DA S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 1, p. 04–05, 2016. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252016000100002&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 23/5/2019.

BOWERS, Robert M.; MCCUBBIN, Ian B.; HALLAR, Anna G.; et al. Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site. **Atmospheric Environment**, v. 50, p. 41–49, 2012. Disponível em: <http://fiererlab.org/wp-content/uploads/2014/09/Bowers_etal_2012_AtmosEnviron.pdf>. Acesso em: 23/5/2019.

BURROWS, S. M.; ELBERT, W.; LAWRENCE, M. G.; PÖSCHL, U. Bacteria in the global atmosphere – Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 9, n. 23, p. 9263–9280, 2009a. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/9/9263/2009/>>. Acesso em: 23/5/2019.

BURROWS, S. M.; BUTLER, T.; JÖCKEL, P.; et al. Bacteria in the global atmosphere – Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 9, n. 23, p. 9281–9297, 2009b. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/9/9281/2009/>>. Acesso em: 23/5/2019.

CRUTZEN, P. J. Geology of mankind. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 23–23, 2002. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/415023a>>. Acesso em: 23/5/2019.

CRUTZEN, P. J.; STOERMER, E. F. The “Anthropocene”. **The International Geosphere-Biosphere Programme (IGBP): A Study of Global Change of the International Council for Science (ICSU)**, v. 41, p. 17–18, 2000. Disponível em: <<http://www.igbp.net/download/18.316f18321323470177580001401/1376383088452/NL41.pdf>>. Acesso em: 23/5/2019.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 104–109, 2011. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000991201000305X?via%3Dihub>>. Acesso em: 23/5/2019.

CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. **UNITED NATIONS**. Rio de Janeiro, 1992. Disponível em: <<https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>>. Acesso em: 23/5/2019.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; DE GROOT, R.; et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253–260, 1997. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/387253a0>>. Acesso em: 23/5/2019.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S.; et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1169–75, 2010. American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164271>>. Acesso em: 23/5/2019.

DARWIN, C. An account of the Fine Dust which often falls on Vessels in the Atlantic Ocean. *Quarterly Journal of the Geological Society*, v. 2, n. 1–2, p. 26–30, 1846. **Geological Society of London**. Disponível em: <<http://jgslegacy.lyellcollection.org/cgi/doi/10.1144/GSL.JGS.1846.002.01-02.09>>. Acesso em: 23/5/2019.

DEGOIS, J.; CLERC, F.; SIMON, X.; et al. First Metagenomic Survey of the Microbial Diversity in Bioaerosols Emitted in Waste Sorting Plants. **Annals of Work Exposures and Health**, v. 61, n. 9, p. 1076–1086, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29136413>>. Acesso em: 23/5/2019.

DELEON-RODRIGUEZ, N. et al. Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 110, nº 7, p. 2575, 2013. DOI:[10.1073/pnas.1212089110](https://doi.org/10.1073/pnas.1212089110). Acesso em: 23/5/2019.

DESPRÉS, V. R. et al. Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. **Biogeosciences**, [s.l.], v. 4, n° 6, p. 1127–1141, 2007. ISSN: 17264189, DOI: [10.5194/bg-4-1127-2007](https://doi.org/10.5194/bg-4-1127-2007).

DESPRÉS, V.; HUFFMAN, J. A.; BURROWS, S. M.; et al. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. **Tellus B: Chemical and Physical Meteorology**, v. 64, n. 1, p. 15598, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3402/tellusb.v64i0.15598>. Acesso em 23/05/2019.

EARTH MICROBIOME PROJECT. 16S Illumina amplicon protocol. **EAP, 2019**. Disponível em: <http://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>. Acesso em: 03/06/2019.

EMIDIO, N. B.; CARPANEZ, A. G.; QUELLIS, L. R.; et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3 e 4, 2015. Disponível em: <http://ojs2.ufjf.emnuvens.com.br/hurevista/article/view/2482>. Acesso em: 15/3/2019.

FERNANDÉZ D. El antropoceno: la expansión del capitalismo global choca con la biosfera. **Barcelona : Virus**, 2011., 2011. Disponível em: <http://libros.metabiblioteca.org/handle/001/490>. Acesso em: 23/05/2019

FOLLONI, S. et al. Detection of airborne genetically modified maize pollen by real-time PCR. **Molecular Ecology Resources**, [s.l.], v. 12, n° 5, p. 810–821, 2012. DOI: [10.1111/j.1755-0998.2012.03168.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03168.x).

FRÖHLICH-NOWOISKY, J.; PICKERSGILL, D. A.; DESPRÉS, V. R.; PÖSCHL, U. High diversity of fungi in air particulate matter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 12814–9, 2009. National Academy of Sciences. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19617562>. Acesso em: 23/5/2019.

FRÖHLICH-NOWOISKY, J.; KAMPF, C. J.; WEBER, B.; et al. Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. **Atmospheric Research**, v. 182, p. 346–376, 2016. Elsevier. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169809516301995>. Acesso em: 23/5/2019.

FUCHS, J.; CERMAK, J. Where Aerosols Become Clouds—Potential for Global Analysis Based on CALIPSO Data. **Remote Sensing**, v. 7, n. 4, p. 4178–4190, 2015. Acesso em: 23/05/2019.

FUJIYOSHI, S.; TANAKA, D.; MARUYAMA, F. Transmission of Airborne Bacteria across Built Environments and Its Measurement Standards: A Review. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5712571/>>. Acesso em: 23/05/2019.

FUKUDA, K.; OGAWA, M.; TANIGUCHI, H.; SAITO, M. Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene. **Journal of UOEH**, set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27627970>>. Acesso em: 17/5/2019.

FYKSE, E. M.; TJÄRNHAGE, T.; HUMPPI, T.; et al. Identification of airborne bacteria by 16S rDNA sequencing, MALDI-TOF MS and the MIDI microbial identification system. **Aerobiologia**, v. 31, n. 3, p. 271–281, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10453-015-9363-9>>. Acesso em: 23/05/2019.

GHOSH, B.; LAL, H.; SRIVASTAVA, A. Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. **Environment International**, v. 85, p. 254–272, 2015. Pergamon. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412015300581?via%3Dihub>>. Acesso em: 23/5/2019.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012. Hindawi. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2012/963401/>>. Acesso em: 23/5/2019.

GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 5, p. 759–769, 2011. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x>>. Acesso em: 22/5/2019.

GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**, v. 1, n. 3, 2013. Disponível em: <<http://www.institutonanocell.org.br/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>>. Acesso em: 23/5/2019.

MELO, L. F. DE. A utilização da espectrometria de massa MALDI-TOF na identificação de microrganismos, 2014. **UFMG**. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-9ZLG5P/a_o_da_espectrometria_de_massas_maldi_tof_na_identifica_o_.pdf?sequence=1>. Acesso em: 23/5/2019.

GANDOLFI, I.; BERTOLINI, V.; AMBROSINI, R.; BESTETTI, G.; FRANZETTI, A. Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 4727–4736, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4901-2>>. Acesso em: 11/5/2019.

GANDOLFI, I.; BERTOLINI, V.; BESTETTI, G.; et al. Spatio-temporal variability of airborne bacterial communities and their correlation with particulate matter chemical composition across two urban areas. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11, p. 4867–4877, 2015. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-6348-5>>. Acesso em: 23/5/2019.

HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; TER STEEGE, H.; et al. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6006, p. 927–31, 2010. American Association for the Advancement of Science. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071659>>. Acesso em: 23/5/2019.

JACKSON, S. N.; MISHRA, S.; MURRAY, K. K. On-line laser desorption/ionization mass spectrometry of matrix-coated aerosols. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 18, p. 2041–2045, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary-wiley.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/rcm.1590>>. Acesso em: 15/3/2019.

JEONG, Y.-S.; CHOI, S.; CHONG, E.; KIM, J. H.; KIM, S.-J. Rapid detection of Bacillus spore aerosol particles by direct in situ analysis using MALDI-TOF mass spectrometry. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 177–183, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary-wiley.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/lam.12261>>. .

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, v. 0, n. 89, p. 114, 2011. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/13873>>. Acesso em: 23/5/2019.

JUNIOR, N. L. S. DESAFIOS DA BIOPROSPECÇÃO NO BRASIL. 2011. **IPEA**. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/13873>>. Acesso em: 23/5/2019.

KAWANAKA, Y.; TSUCHIYA, Y.; YUN, S. J.; SAKAMOTO, K. Size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere and estimation of the contribution of ultrafine particles to their lung deposition. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 17, p. 6851–6856, 2009. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es900033u>>. Acesso em: 23/5/2019.

KHARANGATE-LAD, A. Bacteria Adhered to Particulate Matter and Their Role in Plant Litter Mineralization. **Bioprospects of Coastal Eubacteria**. p.195–207, 2015. Cham: Springer International Publishing. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12910-5_11>. Acesso em: 23/5/2019.

LEE, A. K. Y.; LAU, A. P. S.; CHENG, J. Y. W.; FANG, M.; CHAN, C. K. Source identification analysis for the airborne bacteria and fungi using a biomarker approach. **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 13, p. 2831–2843, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231006011721>>. Acesso em: 23/5/2019.

LIANG, M.; SHU, J.; ZHANG, P.; LI, Y.; SUN, W. Online Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry with *In situ* Mixing. **Analytical Letters**, v. 48, n. 16, p. 2553–2565, 2015. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032719.2015.1043666>>. Acesso em: 23/5/2019.

LIGHTHART, B. Mini-review of the concentration variations found in the alfresco atmospheric bacterial populations. **Aerobiologia**, v. 16, n. 1, p. 7–16, 2000. Kluwer Academic Publishers. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1007694618888>>. Acesso em: 23/5/2019.

LUHUNG, I.; WU, Y.; NG, C. K.; et al. Protocol Improvements for Low Concentration DNA-Based Bioaerosol Sampling and Analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4664469/>>. .

MADSEN, A. M.; ZERVAS, A.; TENDAL, K.; NIELSEN, J. L. Microbial diversity in bioaerosol samples causing ODS compared to reference bioaerosol samples as measured using Illumina sequencing and MALDI-TOF. **Environmental Research**, v. 140, p. 255–267, 2015. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001393511500105X?via%3Dihub>>. Acesso em: 23/5/2019.

MAIER, R. M. Microorganisms and Organic Pollutants. **Environmental Microbiology**, p. 377–413, 2015. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012394626300017X>>. Acesso em: 23/5/2019.

MAKI, T.; KAKIKAWA, M.; KOBAYASHI, F.; et al. Assessment of composition and origin of airborne bacteria in the free troposphere over Japan. **Atmospheric Environment**, v. 74, p. 73–82, 2013. Pergamon. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231013002057>>. Acesso em: 23/5/2019.

MAKI, T.; HARA, K.; KOBAYASHI, F.; et al. Vertical distribution of airborne bacterial communities in an Asian-dust downwind area, Noto Peninsula. **Atmospheric Environment**, v. 119, p. 282–293, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231015302971>>. .

MAKI, T.; HARA, K.; IWATA, A.; et al. Variations in airborne bacterial communities at high altitudes over the Noto Peninsula (Japan) in response to Asian dust events. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 17, n. 19, p. 11877–11897, 2017. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/17/11877/2017/>>. Acesso em: 23/5/2019.

MARTIN, S. T.; ANDREAE, M. O.; ALTHAUSEN, D.; et al. An overview of the Amazonian Aerosol Characterization Experiment 2008 (AMAZE-08). **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 10, n. 23, p. 11415–11438, 2010a. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/10/11415/2010/>>. Acesso em: 23/5/2019.

MARTIN, S. T.; ANDREAE, M. O.; ARTAXO, P.; et al. Sources and properties of Amazonian aerosol particles. **Reviews of Geophysics**, v. 48, n. 2, 2010b.

Disponível em:

<<https://agupubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1029/2008RG000280>>. Acesso em: 23/5/2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. A Biodiversidade Brasileira. **MMA**. 2019.

Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>.

Acesso em: 06/05/2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Arpa – Um novo caminho para a conservação da Amazônia. Programa Áreas Protegidas da Amazônia, 2010. **MMA**. Disponível em:

<<http://arpa.mma.gov.br/wp-content/uploads/2012/10/arpaBiodiversidade.pdf>>.

Acesso em: 23/5/2019.

MIZRAHI-MAN, O.; DAVENPORT, E. R.; GILAD, Y. Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. (B. A. White, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53608, 2013. Public Library of Science. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0053608>>. Acesso em: 23/5/2019.

MORAN-ZULOAGA, D.; DITAS, F.; WALTER, D.; et al. Long-term study on coarse mode aerosols in the Amazon rain forest with the frequent intrusion of Saharan dust plumes. **Atmos. Chem. Phys**, v. 18, p. 10055–10088, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.5194/acp-18-10055-2018>>. Acesso em: 23/5/2019.

MORRIS, C. E. et al. Bioprecipitation: a feedback cycle linking Earth history, ecosystem dynamics and land use through biological ice nucleators in the atmosphere. **Global Change Biology**, [s.l.], v. 20, nº 2, p. 341–351, 2014. ISSN: 1354-1013, DOI:[10.1111/gcb.12447](https://doi.org/10.1111/gcb.12447). Acesso em: 23/5/2019.

NÚÑEZ, A.; AMO DE PAZ, G.; RASTROJO, A.; et al. Monitoring of airborne biological particles in outdoor atmosphere. Part 1: Importance, variability and rat **International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27762424>>. Acesso em: 11/5/2019.

PECCIA, J.; HERNANDEZ, M. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. **Atmospheric Environment**, v. 40, n. 21, p. 3941–3961, 2006. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231006002408>>. .

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* (New York, N.Y.), v. 276, n. 5313, p. 734–40, 1997. **American Association for the Advancement of Science**. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115194>>. Acesso em: 23/5/2019.

POLYMENAKOU, P. N. Atmosphere: A Source of Pathogenic or Beneficial Microbes? **Atmosphere**, v. 3, n. 1, p. 87–102, 2012. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4433/3/1/87>>. Acesso em: 23/5/2019.

PÖSCHL, U.; SHIRAIWA, M. Multiphase Chemistry at the Atmosphere–Biosphere Interface Influencing Climate and Public Health in the Anthropocene. *Chemical Reviews*, v. 115, n. 10, p. 4440–4475, 2015. **American Chemical Society**. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr500487s>>. Acesso em: 23/5/2019.

POLÍTICA NACIONAL DA BIODIVERSIDADE. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4339.htm>. Acesso em: 23/5/2019.

PRUSSIN, A. J.; GARCIA, E. B.; MARR, L. C. **Total concentrations of virus and bacteria in indoor and outdoor air**. *Environmental Science and Technology Letters*, [s.l.], v. 2, n.º 4, p. 84–88, 2015. DOI: [10.1021/acs.estlett.5b00050](https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00050). Acesso em: 23/5/2019.

RIZZOLO, J. A.; BARBOSA, C. G. G.; BORILLO, G. C.; et al. Soluble iron nutrients in Saharan dust over the central Amazon rainforest. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 17, n. 4, p. 2673–2687, 2017. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/17/2673/2017/>>. Acesso em: 23/5/2019.

RYZHOV, V.; FENSELAU, C. Characterization of the Protein Subset Desorbed by MALDI from Whole Bacterial Cells. , 2001. **American Chemical Society**. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0008791>>. Acesso em: 23/5/2019.

SANDRIN, T. R.; GOLDSTEIN, J. E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 32, n. 3, p. 188–217, 2013. **John Wiley & Sons, Ltd**. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mas.21359>>. Acesso em: 17/5/2019.

SANTOS, A. F.; CAYÔ, R.; SCHANDERT, L.; GALES, A. C. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 3, p. 191–197, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1676-24442013000300006&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 11/5/2019.

SAMBO, F.; FINOTELLO, F.; LAVEZZO, E.; et al. Optimizing PCR primers targeting the bacterial 16S ribosomal RNA gene. *BMC Bioinformatics*, v. 19, n. 1, p. 343, 2018. **BioMed Central**. Disponível em: <<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-018-2360-6>>. Acesso em: 17/5/2019.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. **Genome Biology**, v. 6, n. 8, p. 229, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1273625/>>. Acesso em: 23/5/2019.

SEIFRIED, J. S.; WICHELS, A.; GERDTS, G. Spatial distribution of marine airborne bacterial communities. **MicrobiologyOpen**, v. 4, n. 3, p. 475–490, 2015. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mbo3.253>>. Acesso em: 23/5/2019.

SERRANO-SILVA, N.; CALDERÓN-EZQUERRO, M. C. Metagenomic survey of bacterial diversity in the atmosphere of Mexico City using different sampling methods. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 20–29, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117336485?via%3Dihub>>. Acesso em: 22/5/2019.

SETLHARE, G.; MALEBO, N.; SHALE, K.; LUES, R. Identification of airborne microbiota in selected areas in a health-care setting in South Africa. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 100, 2014. Disponível em: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-100>>. Acesso em: 23/5/2019.

SILVA, J. M. C. DA; RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. DA. The Fate of the Amazonian Areas of Endemism. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 689–694, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1523-1739.2005.00705.x>>. Acesso em: 23/5/2019.

SMITH, D. J.; JAFFE, D. A.; BIRMELE, M. N.; et al. Free Tropospheric Transport of Microorganisms from Asia to North America. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 4, p. 973–985, 2012. Springer-Verlag. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00248-012-0088-9>>. Acesso em: 23/5/2019.

SMITH, D. J.; RAVICHANDAR, J. D.; JAIN, S.; et al. Airborne Bacteria in Earth's Lower Stratosphere Resemble Taxa Detected in the Troposphere: Results From a New NASA Aircraft Bioaerosol Collector (ABC). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6102410/>>. Acesso em: 17/5/2019.

SMITH, D. J.; TIMONEN, H. J.; JAFFE, D. A.; et al. Intercontinental Dispersal of Bacteria and Archaea by Transpacific Winds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1134–1139, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3568602/>>. Acesso em: 23/5/2019.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 32, p. 12115–20, 2006.

National Academy of Sciences. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16880384>>. Acesso em: 23/5/2019.

SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; et al. AR4 Climate Change 2007: The Physical Science Basis — **IPCC**. Disponível em:
<<https://www.ipcc.ch/report/ar4/wg1/>>. Acesso em: 23/5/2019.

STALEY, C.; SADOWSKY, M. J. Practical considerations for sampling and data analysis in contemporary metagenomics-based environmental studies. **Journal of Microbiological Methods**, v. 154, p. 14–18, 2018. Elsevier. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770121830695X?via%3Dihub>>. Acesso em: 22/5/2019.

STOCKER, T. F.; QIN, D.; PLATTNER, G.-K.; et al. AR5 Climate Change 2013: The Physical Science Basis — **IPCC**. Disponível em:
<<https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/>>. Acesso em: 23/5/2019.

STRILUK, M. L.; AHO, K.; WEBER, C. F. The effect of season and terrestrial biome on the abundance of bacteria with plant growth-promoting traits in the lower atmosphere. **Aerobiologia**, v. 33, n. 1, p. 137–149, 2017. Springer Netherlands. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10453-016-9456-0>>. Acesso em: 23/5/2019.

SUNI, T.; GUENTHER, A.; HANSSON, H. C.; et al. The significance of land-atmosphere interactions in the Earth system—iLEAPS achievements and perspectives. **Anthropocene**, v. 12, p. 69–84, 2015. Elsevier. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213305415300254>>. Acesso em: 23/5/2019.

SWAP, R.; GARSTANG, M.; GRECO, S.; TALBOT, R.; KÅLLBERG, P. Saharan dust in the Amazon Basin. **Tellus B**, v. 44, n. 2, p. 133–149, 1992. Disponível em:
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1600-0889.1992.t01-1-00005.x>>. Acesso em: 23/5/2019.

TANAKA, D.; SATO, K.; GOTO, M.; et al. Airborne Microbial Communities at High-Altitude and Suburban Sites in Toyama, Japan Suggest a New Perspective for Bioprospecting. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 12, 2019. Frontiers Media SA. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30805335>>. Acesso em: 12/5/2019.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151–153, 1988. John Wiley & Sons, Ltd.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.1290020802>>. Acesso em: 23/5/2019.

TER STEEGE, H.; PITMAN, N. C. A.; SABATIER, D.; et al. Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. **Science**, v. 342, n. 6156, p. 1243092, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1243092>>. Acesso em: 23/5/2019.

TOBO, Y.; ZHANG, D.; NAKATA, N.; et al. Hygroscopic mineral dust particles as influenced by chlorine chemistry in the marine atmosphere. **Geophysical Research Letters**, v. 36, n. 5, p. L05817, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1029/2008GL036883>>. Acesso em: 22/5/2019.

ULTEE, A.; SOUVATZI, N.; MANIADI, K.; KONIG, H. Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 560–568, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2004.02174.x>>. Acesso em: 22/5/2019.

WADE, W. Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 95, n. 2, p. 81–83, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1279316/>>. Acesso em: 1/5/2019.

WILLIAMS, J.; CRUTZEN, P. Perspectives on our planet in the Anthropocene. **Environ. Chem.**, [s.l.], v. 407, p. 674–675, 2013.

WITTMANN, F.; HOUSEHOLDER, E.; PIEDADE, M. T. F.; et al. Habitat specificity, endemism and the neotropical distribution of Amazonian white-water floodplain trees. **Ecography**, v. 36, n. 6, p. 690–707, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0587.2012.07723.x>>. Acesso em: 1/5/2019.

WORLD WIDE FUND FOR NATURE. Amazon Alive! A decade of discovery 1999-2009 | **WWF**. Disponível em: <http://wwf.panda.org/wwf_news/?200056/AmazonAliveAdecadeofdiscovery1999--2009>. Acesso em: 1/5/2019.

WU, L.; LI, X.; KIM, H.; et al. Single-particle characterization of aerosols collected at a remote site in the Amazonian rainforest and an urban site in Manaus, Brazil. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 19, n. 2, p. 1221–1240, 2019. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/19/1221/2019/>>. Acesso em: 1/5/2019.

XU, Z.; WU, Y.; SHEN, F.; et al. Bioaerosol Science, Technology, and Engineering: Past, Present, and Future. *Aerosol Science and Technology*, v. 45, p. 1337–1349, 2011. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/233356428_Bioaerosol_Science_Technology_and_Engineering_Past_Present_and_Future>. Acesso em: 1/5/2019.

YAO, M. Bioaerosol: A bridge and opportunity for many scientific research fields. *Journal of Aerosol Science*, v. 115, p. 108–112, 2018. Pergamon. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021850217302999>>. Acesso em: 23/5/2019.

YOOSEPH, S.; ANDREWS-PFANNKUCH, C.; TENNEY, A.; et al. A metagenomic framework for the study of airborne microbial communities. *PloS one*, v. 8, n. 12, p. e81862, 2013. Public Library of Science. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24349140>>. Acesso em: 22/5/2019.

YU, H.; CHIN, M.; BIAN, H.; et al. Quantification of trans-Atlantic dust transport from seven-year (2007–2013) record of CALIPSO lidar measurements. *Remote Sensing of Environment*, v. 159, p. 232–249, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034425714005021>>. Acesso em: 22/5/2019.

ZHAI, Y.; LI, X.; WANG, T.; et al. A review on airborne microorganisms in particulate matters: Composition, characteristics and influence factors. *Environment International*, v. 113, p. 74–90, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29421410>>. Acesso em: 23/5/2019.

2 CAPÍTULO II

2.1 INTRODUÇÃO

Bioaerossóis é um assunto multidisciplinar, que envolve diferentes campos de pesquisas tais como: microbiologia, bioquímica, engenharias, poluição do ar, saúde pública, epidemiologia, ecologia, física, nanotecnologia, entre outras áreas (YAO, 2018).

A atmosfera é considerada como um dos habitats para a microrganismos aéreos ou bioaerossóis, originados do solo, vegetação e superfícies aquáticas como rios, baías e oceanos, entre outras fontes. A atmosfera possui alta complexidade e variação entre os ambientes e ecossistemas, alguns fatores são essenciais ou limitantes para a presença e desenvolvimento de comunidades microbiológicas, como alta taxa de radiação solar, baixa umidade, baixa concentração de nutrientes e grande capacidade de dispersão (ZHAI et al., 2018).

Dependendo das propriedades do aerossol e das condições meteorológicas, os tempos de residência característicos (vidas úteis) das partículas de aerossóis na atmosfera variam de horas a semanas. Após retornar ao solo, as bioaerossóis viáveis podem continuar a reprodução biológica e a atividade metabólica que pode gerar ainda mais emissão de partículas (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016; SUNI et al., 2015; MORRIS et al., 2014).

O cultivo, aliado às técnicas de análise moleculares como as análises proteômica e genômica, podem fornecer informações extremamente relevantes sobre o microbioma. O presente estudo teve como objetivo determinar a biodiversidade de bactérias cultiváveis em aerossóis em uma área prístina da Floresta Amazônica por análise de espectrometria de massas e sequenciamento do gene rDNA 16S.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo recebeu autorização da Secretaria Estadual do Meio Ambiente do estado do Amazonas, órgão responsável pela gestão da RDS Uatumã para coletas *in loco*, registrado com a autorização N° 97/2018 DEMUC/SEMA. O estudo também está registrado no Sistema Nacional de Patrimônio Nacional Genético e Conhecimento Tradicional Associado, conforme definição da legislação nacional.

Para as coletas, extrações, cultivos e análises dos bioaerossóis, todos os equipamentos e materiais laboratoriais foram cuidadosamente esterilizados, alguns por meio de autoclave à 120° C por 20 min. Os equipamentos e materiais que não suportariam a temperatura e pressão da autoclave foram esterilizados seguindo os protocolos lavagem laboratorial, álcool etílico 70% e radiação ultravioleta em câmara de segurança microbiológica. Os filtros e os amostradores utilizados para a campanha de coleta, foram transportados embalados a vácuo (FIGURA 1), com sílica, previamente montados dentro da câmara de segurança microbiológica, transportados em uma caixa plástica com tampas herméticas, esteril, para evitar contaminação.

FIGURA 1 – CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO DOS FILTROS POR ARMAZENAMENTO EM VÁCUO.



FONTE: O AUTOR (2018).

LEGENDA: (A) Máquina de embalar a vácuo e (B) filtros embalados prontos para o transporte

FIGURA 2 – AMOSTRADORES INSTALADOS E PROCEDIMENTO DE TROCA DE AMOSTRAS



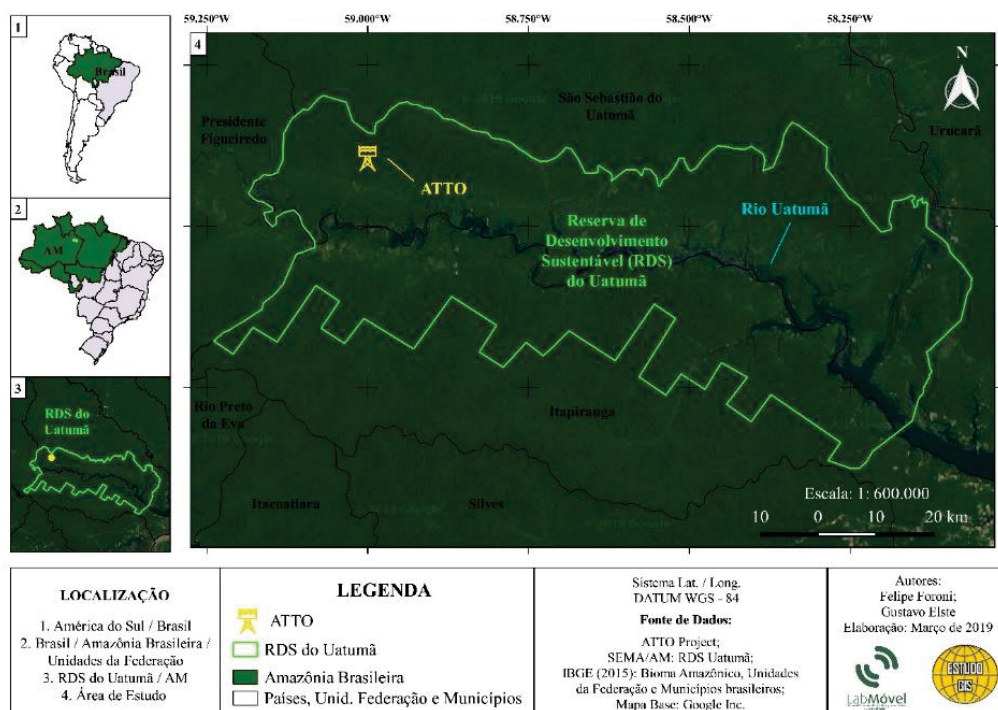
LEGENDA: (A) Amostradores de solo (1 e 2) no momento de coleta;
(B) Pesquisador realizando a troca de amostras;
(C) Amostrador (3) instalado na torre Instant.

2.2.1 LOCAL DE COLETA

As coletas foram realizadas na torre *Instant* e nas suas proximidades (*Walk-up tower*), no Sítio ATTO, na Estação Científica do Uatumã, inserida dentro da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã. Localizada entre os municípios Itapiranga e São Sebastião do Uatumã, na região central do estado do Amazonas, Brasil (S 02° 08.647' W 58° 59.992'), conforme é possível observar mapa a seguir. O local está localizado a aproximadamente 12 km ao NE do rio Uatumã.

A vegetação da RDS Uatumã é classificada como floresta ombrófila densa e abriga diferentes ecossistemas. Florestas de terra firme densas e não inundadas (terra firme) prevalecem em planaltos a uma altitude máxima de aproximadamente 130 m. A floresta igapó, inundada sazonalmente, domina o canal principal do rio, os igarapés e os vários afluentes menores do rio Uatumã. Intercaladas com estas formações estão florestas de terra firme não inundadas em antigos terraços fluviais (35-45 m acima do nível do mar) e campinas (savana em solos de areia branca) e campinaranas (floresta de areia branca), predominantemente localizadas entre os terraços do rio (ANDREAE et al., 2015).

MAPA 1 – LOCALIZAÇÃO DO PONTO DE COLETA



FONTE: ELSTER (2019)

2.2.2 MÉTODOS DE COLETA

2.2.2.1 DESENHO AMOSTRAL

O presente estudo foi conduzido através de uma campanha de coleta de 7 dias, entre os dias 19 e 26 de agosto de 2018, período de seca da região. Foram realizadas coletas simultâneas com os três amostradores no primeiro dia da campanha de coleta (19/08), com um tempo de amostral de 24 horas. A partir do segundo dia de coleta o intervalo de coleta dos amostradores foram alterados, o amostrador um (1) com vazão de 35 L/min passou a operar com coletas de 72 horas, enquanto os amostradores, dois (2) e três (3), permaneceram com coletas de 24 horas. Todas as amostras foram iniciadas e finalizadas no período da manhã, entre as 09:00 e 11:30 am. O ANEXO 1 apresenta uma tabela detalhada com as informações de cada coleta com data, horário inicial e final das amostragens.

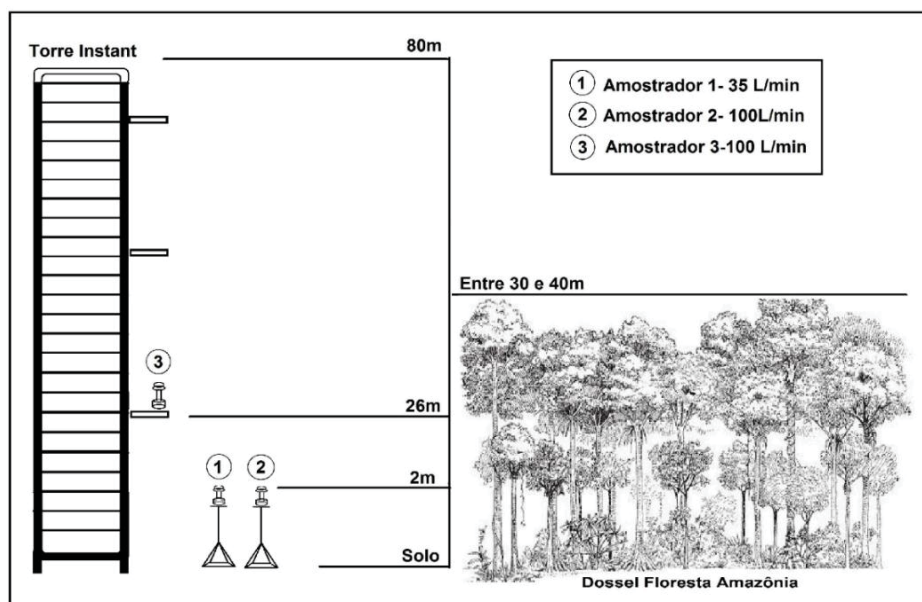
Os filtros que foram utilizados como controle negativo passaram pelo mesmo processo de esterilização em autoclave que os filtros amostrados. Os filtros controles foram instalados dentro dos amostradores Harvard onde permaneceram por 30

minutos, com a bomba desligada, sem operar e sem fluxo de ar, para controle de contaminação dos filtros e amostradores. Esses filtros foram retirados dos amostradores e armazenados em placa Petri, embalados a vácuo com sílica à aproximadamente 4° C em refrigerador

2.2.2.2 DISPOSIÇÃO DOS AMOSTRADORES NO PONTO DE COLETA

Foram realizadas coletas com 3 amostradores Harvard (FIGURA 7), dois amostradores (1 e 2) foram instalados em tripés no solo ao lado da torre *Instant*, a aproximadamente 5 metros de distância da mesma, ficando elevados a 2 metros do solo. O amostrador 1 operou com uma bomba com vazão de 35 L/min e o amostrador 2 operou com uma bomba com vazão de 100 L/min. O amostrador 3 foi instalado na Torre *Instant*, a 26 metros de altura do solo e também operou com vazão de 100 L/min. Os três amostradores foram instalados em pontos inseridos dentro do dossel da Floresta Amazônica, conforme é possível observar na FIGURAS 2 e 3.

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DOS PONTOS ONDE FICARAM INSTALADOS OS AMOSTRADORES DURANTE A CAMPANHA DE COLETA E A ALTURA E O DOSSEL DA FLORESTA AMAZÔNICA



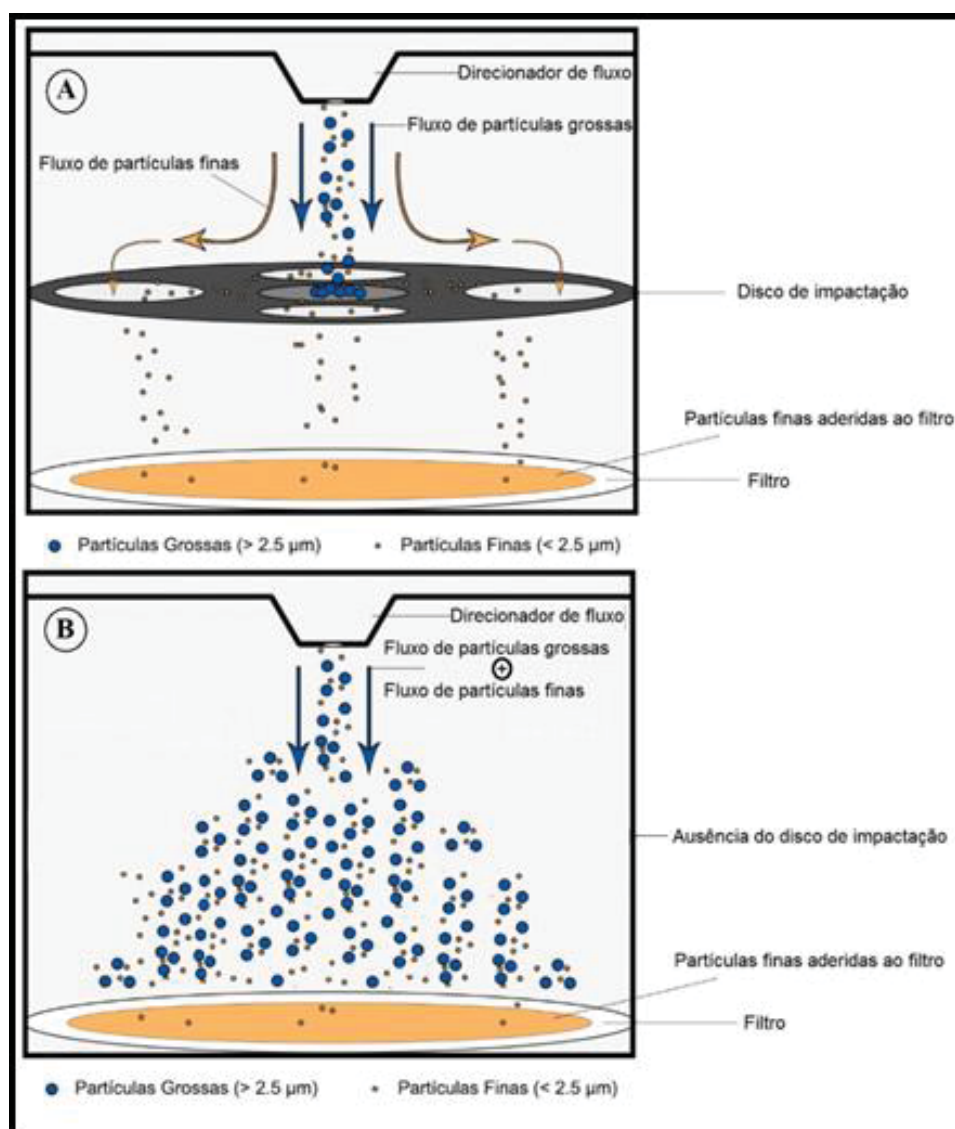
FONTE: O AUTOR (2019)

2.2.2.3 IMPACTADOR INERCIAL HARVARD

Foram utilizados três amostradores do tipo Impactador Inercial Harvard para coleta de bioaerossóis com duas adaptações fundamentais: no fluxo de ar e no disco de impactação. Este equipamento de coleta normalmente é utilizado com a vazão de 10 L/min, neste estudo o fluxo de ar foi adaptado (35 L/min e 100 L/min) com o intuito coletar o maior número de partículas possíveis para a viabilização das análises.

O princípio do método de coleta é por sucção, é direcionado para um disco de impactação, onde as partículas maiores que ponto de corte ficam aderidas (FIGURA 4-A).

FIGURA 4 – PRINCÍPIO E ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DE COLETA DE BIOAEROSSÓIS



FONTE: Adaptado de GURGATZ (2018)

LEGENDA: (A) Princípio de coleta Amostrador Harvard com disco de impactação, e (B) Princípio de coleta Amostrador Harvard sem disco de impactação.

Este disco possui uma fina camada de óleo mineral, responsável por não deixar as partículas saltarem após o impacto, criando um depósito que não se desprende por estarem impregnadas pelo próprio óleo. As partículas menores que o ponto de corte seguem seu caminho até um filtro de polycarbonato *Nuclepore*® de 37 mm de diâmetro com porosidade de 0,8 µm (POLEZER, 2015). Os discos de impactação, que possuem o princípio de separação das partículas coletadas foi removido e todas as amostras foram coletadas sem a presença do disco (FIGURA 4-B), ou seja, a presente pesquisa não trabalha com um ponto de corte para as dimensões aerodinâmicas das partículas coletadas, o objetivo da adaptação também foi de trabalhar com o maior número de partículas possíveis para viabilização das análises. O princípio deste método e a adaptação realizada no amostrador ilustrado a seguir.

2.2.2.4 PROCEDIMENTOS DE COLETA

Como apresentado anteriormente, todos os amostradores e filtros foram transportados a vácuo em recipientes estéreis. Durante as trocas dos filtros, entre as amostragens, foram tomadas providências para evitar contaminação das amostras durante a instalação dos filtros. O pesquisador responsável pela troca dos filtros utilizou luvas estéreis (FIGURA 2B) e manteve os filtros isolados a vácuo até poucos segundos antes da instalação do filtro no amostrador. Ao retirar as amostras, elas eram diretamente colocadas em placa Petri estéril e embalada sob vácuo em poucos momentos após a retirada. Durante a campanha de coleta e transporte entre o ponto de coleta até os laboratórios da Universidade Federal do Paraná, setor Litoral, as amostras foram mantidas sob refrigeração para conservação das amostras coletadas.

2.2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

2.2.3.1 CULTIVO DE CÉLULAS VIÁVEIS

As amostras foram encaminhadas extração das células viáveis do filtro, o procedimento foi realizado em câmara de segurança microbiológica. No total foram realizadas 5 amostragens em filtros de polycarbonato para identificação por cultivos de

células viáveis, sendo três amostras referentes ao primeiro dia de amostragem (19/08/2018) e duas amostras coletadas com os amostradores 2 e 3 (26/08/2018) no último dia coleta.

Os filtros foram colocados em tubos *falcon* com 2 mL de meio LB, os tubos passam por agitação em vórtex por aproximadamente dois minutos. O filtro controle passou pelo mesmo procedimento de extração. Após a extração em meio líquido, alíquotas de 100µL foram espalhados na superfície das placas Petri com meio de cultura. Foram utilizados para cultivo das células viáveis quatro diferentes meios de cultura sólido, sendo eles: LB (MILLER, 1972), *Citrate Ágar (Himedia®)*, *Tryptone Soya Yeast Extract Agar (Himedia®)* e M9 que contém em sua composição (g/L): ágar bacteriológico (15g), H₂O destilada (750 mL), sais para M9 5x (200 mL), MgSO₄ 1mol/L (1,6 mL), CaCl₂(50 µL), glucose 1% (50 mL) como fonte de carbono. Todas as placas foram preparadas com o fungicida ciclohexamida 0.05% (p/v) a fim de inibir o crescimento de fungo.

As placas Petri foram identificadas de acordo com os filtros das quais foram extraídas e o meio de cultura utilizado, e então incubadas a 30° C para o monitoramento de crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) após 24 h/ 48 h/ 72 h/ 96 h/ 120 h. Durante o monitoramento, conforme as colônias surgiram, foram identificadas e codificadas (ANEXO 2). Após cinco dias (120 h) de monitoramento de crescimento das UFC, com as colônias já desenvolvidas nas placas referentes aos filtros das quais foram extraídas, foram isoladas 78 UFC. Cada um deste 78 isolados foram cultivados em novas placas a fim de evitar contaminação e obter culturas puras para as análises seguintes.

2.2.4 ARMAZENAMENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

As unidades formadoras de colônias, após o re-isolamento, foram armazenadas seguindo dois diferentes métodos, armazenamento a -20° C em glicerol 50% (v/v), neste procedimento foi colocado com materiais estéreis, uma palitada de cada colônia isolada em eppendorfs contendo 500 µL da solução glicerol 50%, esta mistura foi passou por agitação em vórtex por aproximadamente 2 minutos, para diluição das colônias pipetadas. Após a agitação as amostras foram armazenadas em freezer a -20° C.

O outro método de armazenamento das amostras foi por meio de cultivo e armazenamento em meio sólido. Cada colônia foi armazenada no mesmo meio onde foi desenvolvida originalmente. Foi inserido 1 mL de meio contendo fungicida ciclohexamida 0.05% (p/v) na mesma proporção que o plaqueamento inicial em eppendorfs de 1,5 mL previamente esterilizados. Nos tubos foram inseridos palitadas de cada colônia individualmente e mantidos em 30° C por 120 horas para desenvolvimento das unidades formadoras de colônias. Após o período, um grupo contendo todas as colônias foi armazenada em temperatura ambiente e outro grupo foi armazenado em refrigerador a aproximadamente 4° C.

2.2.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS MALDI-TOF

A técnica de análise molecular MALDI TOF é considerada uma forma rápida para identificação de microrganismos. Amplamente utilizado para análises clínicas, o software *MALDI Biotyper* possui um diverso banco de dados com milhares de microrganismos catalogados em sua biblioteca. Apesar de sua biblioteca conter um número de microrganismos de interesse clínico, o *Biotyper* também tem sido utilizado para análises ambientais.

Estrategicamente, esta técnica foi o primeiro método de análise molecular utilizado pelo presente estudo. Através das triplicatas (três pequenas frações da mesma cultura colocadas em poços separados) dos isolados e da criação dos MSP, foi possível obter informações sobre de nossas culturas que possibilitaram traçar um plano para a identificação por amplificação e sequenciamento do gene rDNA 16S.

Após o desenvolvimento das culturas de bactérias nas placas Petri isoladas, estas foram encaminhadas para análise de espectrometria de massa pela técnica MALDI-TOF (*matrix assisted lazer desorption/ionization – time of flight*) utilizando equipamentos e software da Bruker Daltonics, MALDI AUTOFLEX TOF/TOF, *Bruker Daltonics flexControl* 3.3.108.0 e o *Bruker Daltonics flexAnalysis software* (3.3.80.0). Foram obtidos perfis proteicos com triplicatas selecionadas das culturas bacterianas previamente isoladas. As triplicatas foram realizadas com o intuito de refinar a análise do perfil proteico de cada cultura isolada, por comparação entre cada triplicata.

Para isso, as amostras foram inseridas em poço da placa de MALDI (*Bruker Daltonics*), todos os isolados (n=78) foram analisadas em triplicata totalizando 238 poços da placa preenchidos. Cada amostra foi coberta com 1µL da solução matriz

para MALDI, contendo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma) saturado em solução contendo acetonitrila (50 μ L), de ácido trifluoracético (2,5 μ L) e H₂O (47,5 μ L). Subsequente a aplicação da matriz, foi realizada secagem ao ar, dentro de câmara de segurança microbiológica.

Cada perfil das triplicatas foi conferido para averiguação de similaridade entre os outros perfis das triplicatas da mesma amostra e para a exclusão de amostras que não apresentaram qualidade de leitura, o critério para exclusão foi: no mínimo 3 picos e 5.000 de intensidade (m/z). Esta parte operacional foi realizada manualmente através do software FlexAnalysis (versão 3.0), onde é possível observar os espectros gerados pela análise em MALDI-TOF (BARREIRO, 2010).

Após a análise de cada amostra em comparação com banco de espectros do MALDI *Biotyper* (versão 3.1) foram elaborados dendrogramas com os perfis proteicos obtidos nas três baterias realizadas, no total foram realizadas três baterias de análises correspondendo a primeira bateria a análise de todas as culturas isoladas e a segunda e terceira baterias de culturas selecionadas a partir da análise do primeiro dendrograma gerado.

Utilizando o mesmo programa foi produzido MSP (*Main Spectra Projections*) de cada cultura através do método padrão de criação de MSP e salvo como um banco de dados da pesquisa, no próprio software. Um MSP contém a massa média e a intensidade média dos picos selecionados bem como a frequência dos picos em múltiplas medições, através de um algoritmo imparcial é criado o MSP, extraindo informações sobre a posição de pico, intensidade e frequência, enquanto emprega correções de ruídos (TIMPERIO et al., 2017).

Com os MSP foi gerado um dendrograma com todas as amostras das quais foram obtidos espectros. O dendrograma de MSP é produzido a partir das semelhanças dos perfis proteicos de cada amostra, ou seja, mostram como os organismos estão intimamente relacionados uns aos outros por dois parâmetros: medida de distância por correlação e ligação por média, normalizada entre a distância 0 (concordância total) e 1000 (sem concordância) (BIOTYPER v.3.1).

2.2.6 MANIPULAÇÃO MATERIAL GENÉTICO

2.2.6.1 EXTRAÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO DAS CULTURAS ISOLADAS

Após o cultivo das culturas e análise em MALDI TOF, foi realizado a extração, amplificação e sequenciamento do material genético de cada cultura selecionada. Para o sequenciamento dos amplicons do gene 16S rDNA foram inicialmente selecionadas culturas a partir do nível de distância de correlação 0,4 do primeiro dendrograma gerado em MALDI TOF. Os isolados foram submetidos a extração de material genômico através do *UltraClean Microbial DNA isolation Kit* (MO BIO). No protocolo de extração foi adicionado a etapa de aquecimento a 70 °C por 10 minutos, para aumentar o rendimento da extração, conforme o próprio protocolo de extração do kit indica na seção “Sugestões e Guia de Solução de Problemas”.

2.2.6.2 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO DE POLIMERASE

O material genético extraído foi levado para o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, e com o auxílio do técnico Valter Antonio de Baura, responsável pelo espaço foi realizada a amplificação e sequenciamento do material genético.

Para a reação em cadeia de polimerase foram utilizados iniciadores universais 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG'3 e 1492R 5'ACCTTGTTACGACTT'3 (*forward* e *reverse*, respectivamente) (LANE et al., 1991). O protocolo da PCR utilizado para reação de amplificação ocorreu em 20 uL de uma mistura de: H₂O Milli-Q esterilizada (10,3 µL), tampão MgCl₂ 10x (4 µL), dNTP 200 µM (0,8 µL), 0,8 µL (10µM) de cada iniciador, 1 µL de GoTaq® DNA Polimerase (5 U/µL) (*Promega*) e 2 µL de amostra de DNA.

A amplificação foi realizada em Termociclador *Applied Biosystems* modelo *Veriti*®. O ciclo de amplificação foi de três estágios, no primeiro as amostras são aquecidas a 95 °C por 4 minutos. O estágio dois consistiu num processo de 30 segundos a 95 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C, processo repetido por 35 vezes. E para finalizar o estágio três manteve a amostra a 72 °C por 5 minutos. Após a amplificação, para a purificação do material foi adicionado 1 µL de mix de EXO/SAP e água Milli-Q e retornou para o termociclador à temperatura de 37°C por 60 minutos e à 80°C por 15 minutos.

2.2.6.3 REAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados usando *BigDye Terminator mix* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, California, USA), usando o seguinte programa: 2 min a 96 °C e 30 ciclos de 15 s a 96 °C, 30 s a 55.4 °C e 4 min a 60 °C em sequenciador automático ABI XL3500.

2.2.6.4 ANÁLISE DE SEQUENCIAS

As sequências foram analisadas e editadas através do software livre *BioEdit* (HALL, 1999). Para amostras que apresentaram amplificação e sequenciamento com qualidade a partir dos primers 27F e 1492R foram gerados *CAPContig* para identificação do genoma de cada isolado. Após o sequenciamento os dados obtidos passaram por comparação com o banco de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e *Ribosomal Database Project* (RDP) para tentativa de identificação das culturas coletadas no *Ribosomal Database Project* (COLE et al., 2009) e no banco de dados “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria/Archaea)” do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997).

2.3 RESULTADOS

Um total de 5 filtros com amostras coletadas *in loco* foram encaminhados para cultivo de células viáveis e posteriores análises moleculares.

2.3.1 CULTIVO DE BACTÉRIAS

No final de período de incubação para desenvolvimento das colônias (120 h/30 ° C), não foi identificada nenhuma cultura para o filtro utilizado como controle negativo e foi contabilizado o total de 78 (n=78) colônias desenvolvidas em todas as placas Petri, incluindo as duplicatas. O meio de cultura que apresentou o maior número e diversidade de colônias desenvolvidas foi *Tryptone Soya*, com 35 colônias, em seguida o meio de cultura que apresentou o segundo maior número e diversidade de colônias foi o meio LA com 20 colônias, em seguida o meio M9 com 18 colônias desenvolvidas e o meio que apresentou a menor quantia de colônias desenvolvidas foi o meio *Citrate Ágar* com 5 colônias desenvolvidas no período.

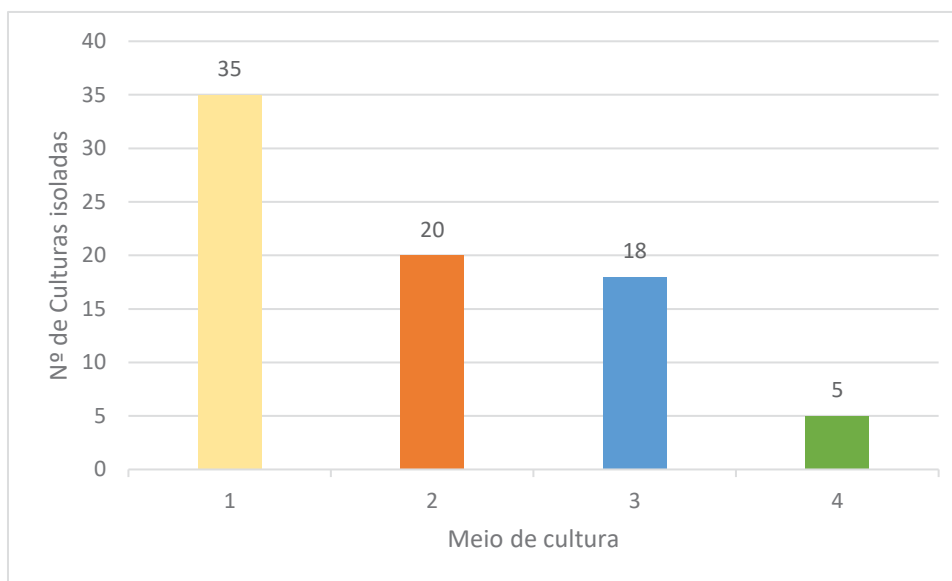
TABELA 1 – COLÔNIAS ISOLADA POR MEIO DE CULTIVO

Meio de cultivo	Colônias identificadas após incubação
<i>Tryptone Soya</i>	35
LA	20
M9	18
<i>Citrate Ágar</i>	5
Total de colônias	78

FONTE: O AUTOR (2019)

LEGENDA: Quantia de colônia por meio de cultura após 120 horas (30 ° C).

GRÁFICO 1 – NÚMERO DE COLÔNIAS ISOLADAS POR MEIO DE CULTURA



FONTE: O AUTOR (2019)

LEGENDA: Quantia de isolados por meio de cultura utilizado.

O filtro que apresentou maior número de colônias desenvolvidas foi o filtro nomeado como 1-1, que foi coletado com o amostrador 1 no primeiro dia de coleta. Instalado a 2 metros do solo operando com a bomba com menor vazão de ar entre as bombas utilizadas (35 L/min), deste filtro foram identificadas e isoladas o total de 38 colônias, nos filtros coletados neste mesmo dia foram identificadas 14 colônias no filtro 2-1 instalado ao lado do amostrador 1 a 2 metros do solo operando com a bomba de ar com vazão de ar (100 L/min), e 5 colônias no filtro 3-1 instalado na torre *Instant* a 26 metros de altura do solo. Os dois filtros que foram amostrados no último dia da campanha de coleta apresentaram o desenvolvimento de 10 colônias no filtro 2-7 que foi coletado em tripé a 2 metros do solo e 11 colônias no filtro 3-7 que foi coletado na torre *Instant*.

TABELA 2 – NÚMERO DE COLÔNIA POR AMOSTRA

Amostra	Número de colônia
Controle negativo	0
1-1	38
2-1	14
3-1	5
2-7	10
3-7	11
Total de colônias	78

FONTE: O AUTOR (2018)

2.3.2 ANALISE EM MALDI-TOF E *BIOTYPER*

Foram realizadas três baterias de análise em triplicata, a primeira bateria contendo todas as culturas isoladas (n=78) e a segunda e terceira bateria contendo parte das culturas isoladas (n=30), selecionados a partir de um dendrograma gerado com os todos os perfis proteicos da primeira bateria.

Todos os perfis proteicos gerados passaram por comparação com o banco de MSP do *Biotyper*, que possui 7.318 organismos catalogados em sua biblioteca para identificação de gênero ou espécie, dos quais nenhum dos perfis amostrados apresentou similaridade para nenhum nível taxonômico com os MSP da biblioteca do programa. Sendo então, todas as culturas analisadas desconhecidas por esse banco de dados, que tem como principal propósito a aplicação clínica, sendo assim, limitado para amostras ambientais.

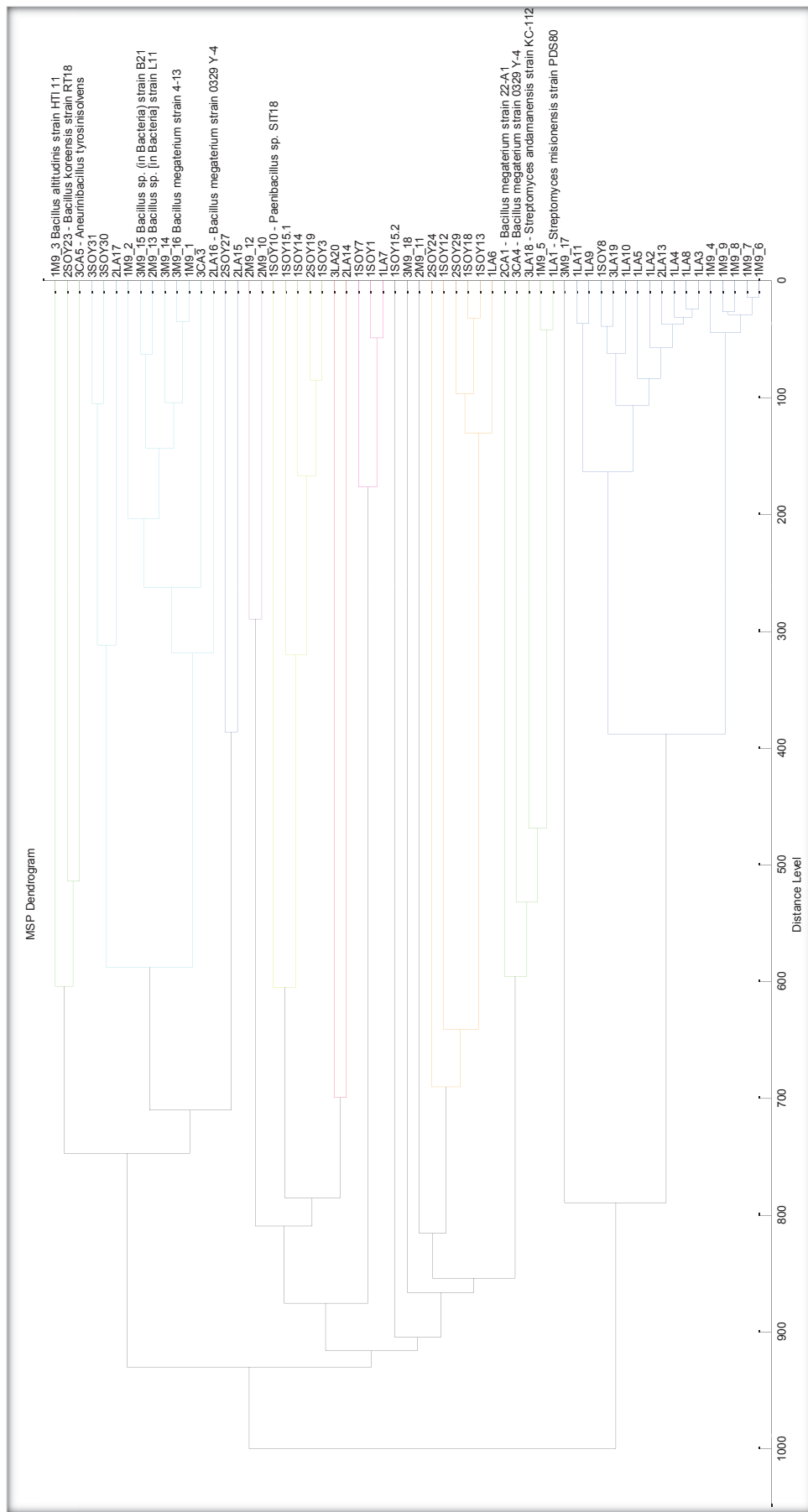
No dendrograma (ANEXO 3) gerado com os espectros da primeira bateria (n=78), notamos que as correlações de distância entre as triplicatas das culturas isoladas possuem proximidade até o nível de distância 0,4 do dendrograma, o que em termos práticos indica que os perfis proteicos das amostras que estão entre as triplicatas possivelmente se tratam da mesma espécie, pois as triplicatas que deveriam estar em paralelo. Seguindo este raciocínio, de que nas ramificações do dendrograma, correspondentes do nível de distância 0 até o nível 0,4 tratava-se das mesmas culturas, foram então selecionadas culturas isoladas de cada parte

ramificação do dendrograma a partir de 0,4 para uma nova bateria de análises com triplicata.

Decorrente desta constatação foram realizadas as duas baterias de aquisição de perfil proteico em MALDI-TOF com (n=30) culturas, todas com triplicatas. Os perfis foram novamente comparados com o banco de MSP do *biotyper* para identificação de gênero ou espécie, e novamente nenhum perfil das amostras analisadas foi identificado no software. A aquisição dos espectros foi realizada duas vezes consecutivas, configurando desta vez duas baterias de análise em MALDI. Foram gerados dendrogramas separadamente para cada uma das duas baterias, os quais ficaram praticamente idênticos e apresentaram agrupamento paralelo das triplicatas de cada cultura, os dendrogramas estão presentes no ANEXO 3 com melhor resolução para visualização.

Após 3 baterias de análises foi obtido o espectro proteico da maior parte das culturas (n=56) variando entre 2 e 9 espectros por UFC. Esses espectros foram utilizados para a elaboração do MSP destas culturas e armazenadas no banco de dados do *biotyper*, dando início a nossa própria biblioteca de culturas. Utilizando os MSP criados foi elaborado um dendrograma de MSP (FIGURA 5).

FIGURA 5 – MSP DENDROGRAMA



FONTE: Software Biotyper (2019)

LEGENDA: Dendrograma gerado com MSP de 56 das 78 culturas isoladas, as demais culturas não apresentaram espectro durante as análises. As culturas que apresentam além do código de isolado, um nome para espécie, foram identificadas a partir de sequenciamento amplicon do gene 16S rDNA, conforme é melhor explicado a seguir.

2.3.3 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS DO GENE

16S rDNA

Dos 78 isolados cultivados, 35 foram selecionados para identificação por sequenciamento do gene 16S rDNA. Esta seleção foi orientada a partir dos resultados observados com as análises de MALDI. Dentre as 35 culturas, até o momento 14 foram parcialmente identificadas a partir de sequenciamento amplicon, correspondendo a 40% das colônias analisadas e aproximadamente 18% do total de isolados cultivados. As TABELAS 3 e 4 apresenta os isolados que apresentaram sucesso na identificação.

As sequencias dos isolados que apresentaram qualidade de sequenciamento foram agrupadas. As sequencias apresentaram entre 679-1404 pares de bases (pb) e estão detalhadas na TABELA 3.

TABELA 3 – DETALHES DOS ISOLADAS PARCIALMENTE IDENTIFICADOS NO BLAST

Código Amostra	Total pb	Espécie (BLAST)
2CA1	1356	<i>Bacillus megaterium strain 22-A1</i>
3CA4	1404	<i>Bacillus megaterium strain 0329 Y-4</i>
3CA5	700	<i>Aneurinibacillus tyrosinisolvans</i>
1LA1	722	<i>Streptomyces misionensis strain PDS80</i>
2LA16	679	<i>Bacillus megaterium strain 0329 Y-4</i>
3LA18	739	<i>Streptomyces andamanensis strain KC-112</i>
1M9_3	1198	<i>Bacillus altitudinis strain HTI 11</i>
2M9_13	1299	<i>Bacillus sp. (in: Bacteria) strain L11</i>
3M9_15	1288	<i>Bacillus sp. (in: Bacteria) strain B21</i>
3M9_16	1214	<i>Bacillus megaterium strain 4-13</i>
1SOY10	680	<i>Paenibacillus sp. SIT18</i>
1SOY15	1371	<i>Staphylococcus sp. strain R306</i>
2SOY23	1294	<i>Bacillus koreensis strain RT18</i>
3SOY35	1165	<i>Gordonia hongkongensis strain 5-5 16S</i>

FONTE: O AUTOR (2019).

LEGENDA: A tabela apresenta o total de pares de base obtidos pelo sequenciamento de cada cultura e a espécie com maior similaridade encontrada no banco de dados BLAST.

TABELA 4 – IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS EM DOIS DIFERENTES BANCOS DE DADOS

FONTE: O AUTOR (2019).

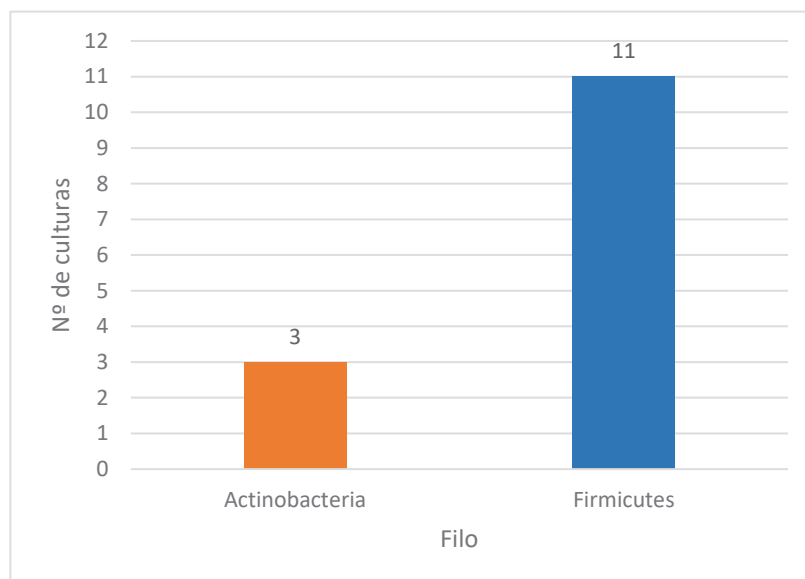
Código Amostra	Query Cover (BLAST)	Ident. (BLAST)	Espécie (BLAST)	RDP	TAXON (RDP)
2CA1	100%	100%	<i>Bacillus megaterium strain 22-A1</i>	Bacillus	Gênero
3CA4	100%	100%	<i>Bacillus megaterium strain 0329 Y-4</i>	Bacillus	Gênero
3CA5	100%	99,14%	<i>Aneurinibacillus tyrosinisolvans</i>	Aneurinibacillus	Gênero
1LA1	100%	100%	<i>Streptomyces misionensis strain PDS80</i>	Streptomyces	Espécie
2LA16	100%	100%	<i>Bacillus megaterium strain 0329 Y-4</i>	Bacillus	Gênero
3LA18	100%	100%	<i>Streptomyces andamanensis strain KC-112</i>	Streptomyces	Espécie
1M9_3	100%	100%	<i>Bacillus altitudinis strain HTI 11</i>	Bacillus	Gênero
2M9_13	100%	100%	<i>Bacillus sp. (in: Bacteria) strain L11</i>	Bacillus	Gênero
3M9_15	100%	100%	<i>Bacillus sp. (in: Bacteria) strain B21</i>	Bacillus	Gênero
3M9_16	100%	100%	<i>Bacillus megaterium strain 4-13</i>	Bacillus	Gênero
1SOY10	100%	100%	<i>Paenibacillus sp. SIT18</i>	Paenibacillus	Gênero
1SOY15	100%	100%	<i>Staphylococcus sp. strain R306</i>	Staphylococcus	Gênero
2SOY23	100%	100%	<i>Bacillus koreensis strain RT18</i>	Bacillus	Gênero
3SOY35	100%	100%	<i>Gordonia hongkongensis strain 5-5 16S</i>	Gordônia	Espécie

LEGENDA: A tabela apresenta as culturas parcialmente sequenciadas, os índices Query Cover (%), Identity (%) e espécie com maior similaridade encontrada na busca no BLASTn. Apresenta também os resultados obtidos pela comparação das sequências com o banco de dados RDP, com o nível taxonômico e cluster de cada cultura sequenciada.

A TABELA 4 apresenta o resultado da comparação da sequência de 16S dos isolados com as sequências depositadas em dois diferentes bancos de dados (BLAST e RDP). No BLAST as culturas apresentaram alta similaridade com espécies depositadas no banco de dados, apenas um isolado (3CA5) apresentou similaridade na identificação inferior a 100%, todas as demais apresentaram índices de *query cover* e identificação de 100%. No RDP parte dos isolados (n=3) foram classificados até o nível de espécie com 100% e o restante dos isolados foram classificados até o nível de gênero.

O GRÁFICO 1 apresenta a abundância dos isolados identificados por filo. Foram identificados apenas dois filós entre os organismos identificados, os filós observados foram *Firmicutes* (11) e *Actinobacteria* (3)

GRÁFICO 2 – ABUNDÂNCIA POR FILO

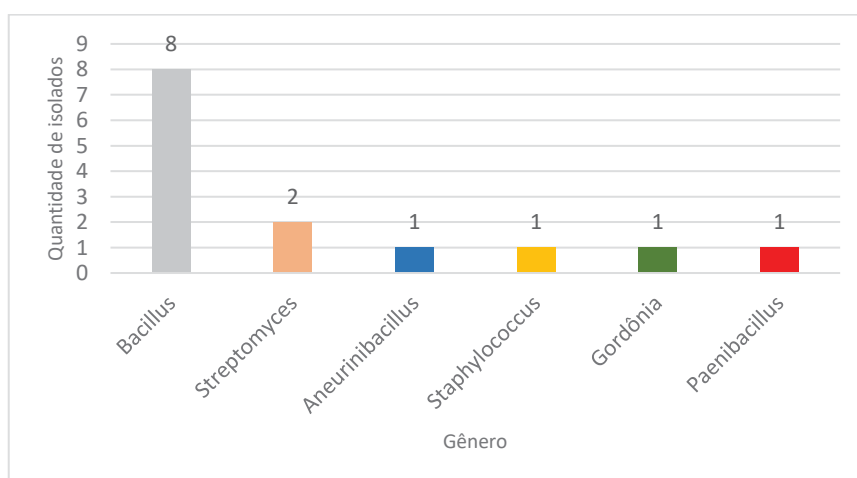


FONTE: O AUTOR (2019)

LEGENDA: Abundância de culturas por filo de acordo com as classificações dos softwares BLAST e RDP.

O GRÁFICO 2 apresenta a abundância das culturas identificadas por gênero segundo os bancos de dados BLAST e RDP. Foram identificados 6 gêneros dentre os organismos identificados, o mais abundante foi *Bacillus* (8) o segundo gênero com maior abundância identificada foi *Streptomyces* (2) e quatro gêneros apresentaram um isolado identificado cada, sendo eles: *Paenibacillus*; *Staphylococcus*, *Aneurinibacillus* e *Gordônia*.

GRÁFICO 3 – ABUNDÂNCIA POR GÊNERO (BLAST E RDP)



FONTE: O AUTOR (2019)

LEGENDA: Gráfico apresentando a abundância por gênero das culturas isoladas, parcialmente identificadas e classificadas por BLAST e RDP.

2.4 DISCUSSÃO

O filtro que apresentou a maior quantidade de culturas desenvolvidas foi o filtro 1.1 (n=38). Este filtro foi coletado no primeiro dia da campanha de coleta, teve a duração de 24 horas de amostragem e foi coletado utilizando uma bomba de 35 L/min, a vazão utilizada para a coleta pode ter sido determinante que esse filtro tenha apresentado a maior quantidade de culturas desenvolvidas. O filtro utilizado como controle negativo, como o esperado, não apresentou desenvolvimento de culturas durante a parte de cultivo celular.

A passagem de ar contínua e prolongada pelo filtro durante a amostragem pode inviabilizar o cultivo de culturas após a coleta. Isso porque o fluxo de ar pode estressar e ressecar organismos menos resistentes (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016).

O filtro 2.1 foi coletado na mesma altura, a poucos metros de distância do amostrador onde foi coletada a amostra 1.1. Foram iniciados e finalizados no mesmo momento, com a única diferença no fluxo de ar empregado nas coletas, o amostrador 2, utilizado para coletar o filtro 2.1 operou com fluxo de ar de 100 L/min. Neste filtro observamos o desenvolvimento de menos da metade (n=14) das culturas que foram contabilizadas no filtro 1.1.

O meio de cultura *Tryptone Soya* foi o meio que apresentou o maior número (n=35) de culturas desenvolvidas, é um meio versátil, de uso geral, altamente nutritivo para o crescimento de bactérias e fungos. Devido à inclusão de triptona e peptona de soja, o meio suporta um crescimento de muitos organismos exigentes. Em seguida, o meio que apresentou maior número de colônias foi o meio LA (n=20), assim como o meio *tryptone soya* o meio LA é considerado um meio altamente nutritivo.

A FIGURA 5 apresenta a classificação dos MSP criado para cada isolado, na imagem é possível notar que há dois clusters separados na distância de nível mais alta (1000), o que indica que os perfis proteicos em cada um dos dois cluster apresentam pouca de semelhança entre eles. O cluster localizado na parte superior da figura concentra a maior parte das culturas isoladas (n=40) e parcialmente identificadas por sequenciamento 16S, enquanto o cluster da parte inferior apresenta a menor parte das culturas isoladas (n=16) e nenhuma destas foi identificada por sequenciamento 16S.

Devido a aparência morfológica, aos resultados das análises de massas moleculares e tentativas malsucedidas de amplificação por PCR dos isolados deste cluster ainda não classificado, surgiram suspeitas de que talvez não sejam bactérias, e sim fungos resistentes a ciclohexamida. Este cluster que até o momento não apresentou amplificação de material genético, passará por outras tentativas e estratégias para a amplificação e o sequenciamento.

Dentre os 14 isolados parcialmente identificados até o momento, 11 pertencem ao filo *Firmicutes*, enquanto 3 foram classificados no filo *Actinobacterias*. No dendrograma gerado com o MSP destes isolados é possível observar um pareamento entre duas *Actinobacterias*, *Streptomyces misionensis strain PDS80* e *Streptomyces andamanensis strain KC-112*. O outro isolado identificado como pertencente ao filo *Actinobacterias*, *Gordonia hongkongensis strain 5-5 16S*, não apresentou espectros proteicos com qualidade para análise. Os isolados classificados no filo *Firmicutes* também apresentaram pareamento entre eles, entretanto, formaram um cluster muito amplo. O isolado identificado como *Staphylococcus sp. strain R306* não apresentou espectros proteicos com qualidade para análise, entretanto, outros 11 isolados foram classificados como pertencentes ao filo *Firmicutes* e estes podem ser observados no dendrograma de MSP.

O filo *Firmicutes* apresentou a maior abundância de culturas isoladas parcialmente identificadas (*Bacillus megaterium strain 22-A1*; *Bacillus megaterium strain 0329 Y-4*; *Aneurinibacillus tyrosinisolvens*; *Bacillus megaterium strain 0329 Y-4*; *Bacillus altitudinis strain HTI 11*; *Bacillus sp. (in: Bacteria) strain L11*; *Bacillus sp. (in: Bacteria) strain B21*; *Bacillus megaterium strain 4-13*; *Paenibacillus sp. SIT18*; *Staphylococcus sp. strain R306*; *Bacillus koreensis strain RT18*).

Para gênero, *Bacillus* foi o gênero com maior abundância identificada (n=8), outros estudos também observaram o gênero como o mais abundante na atmosfera. Este dado foi observado em outros estudos realizados anteriormente.

O filo *Firmicutes* foi relatado como estando predominantemente no ar logo acima do solo durante os eventos de poeira na Ásia (JEON et al. 2011). São os

isolados mais prevalentes obtidos de partículas de poeira mineral coletadas sobre áreas a favor do vento (HUA et al., 2007; GORBUSHINA et al., 2007).

No deserto de Gobi, os eventos de poeira aumentam a diversidade de comunidades microbianas transportadas pelo ar; após eventos de poeira, bactérias formadoras de esporos, como *Bacillus*, aumentam sua abundância (MAKI et al., 2017). Assim, na atmosfera, os membros de *Bacillus* associados a partículas de poeira podem ser transportados por longas distâncias (MAKI et al., 2017).

Em um estudo realizado na Europa, os resultados da amostragem de ar realizada na Noruega, Suécia e Finlândia identificaram *Firmicutes* gram-positivos como o filo com maior predominância e para gênero *Bacillus* e *Staphylococcus* em cultivo em meio *Trypticase soy agar* (TSA) a 30 ° C (FYKSE et al., 2015) *Firmicutes* também foi o filo com maior abundância em outro estudo de microbiologia da atmosfera superior realizado coletando bioaerossóis transpacíficos, o estudo utilizou dois diferentes meios de cultura Difco™R2A e *potato dextrose agar* (PDA) a 25 ° C (SMITH et al., 2012).

No presente trabalho, dos isolados classificados como *Firmicutes* a metade (n=4) foi classificada como *Bacillus megaterium* (2CA1, *Bacillus megaterium* strain 22-A1; 3CA4 *Bacillus megaterium* strain 0329 Y-4; 2LA16, *Bacillus megaterium* strain 0329 Y-4; 3M9_16 *Bacillus megaterium* strain 4-13). Em um estudo realizado por Zheng et al., (2018) que a presença de *B. megaterium* na rizosfera pode beneficiar a assimilação de fosforo (P) pelas plantas e que o gênero solubiliza mais P que demais gêneros como *Streptomyces*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*.

O isolado 1M9_3, foi classificado com alta semelhança para a espécie *Bacillus altitudinis* (strain HTI 11). A espécie *B. altitudinis* foi inicialmente identificada por Shivaji et al., (2006), coletada em acima de 41 Km de altitude em tubos criogênicos. Com testes de resistência à radiação Ultravioleta, o estudo observou que a espécie possui acentuada resistência à mesma, o que justificaria a presença desses microrganismos em grandes altitudes em estado viável para cultivo celular.

Outro estudo, realizado por Kobayashi et al., (2015) os isolados de *Bacillus* obtidos de amostras atmosféricas mostraram resistência de alto nível à irradiação UV do que os isolados normais.

A espécie *B. altitudinis* foi identificada na atmosfera de floresta tropical em Singapura (VETTATH et al., 2017) e em outros habitats, como: solo, águas oceânicas profundas, mangue, rizosfera vegetal, secreções de insetos, peixes e minas de cobre (VIJAY KUMAR et al., 2011; ESAKKIRAJ et al., 2012; SUNAR et al., 2015; HALDER et al., 2017; GCM WFCC; 2019; BUDIHARJO et al., 2017).

O isolado 2SOY23, foi classificado com alta similaridade (100% ident) do gene rDNA 16S para *Bacillus koreensis strain RT18*, a sequência deste *B. koreensis* armazenada no banco GenBank, foi coletada em uma pesquisa sobre bactérias endófitas em culturas de arroz, na Coréia do Sul (DIXIT, 2018). Segundo Anbu P, (2013) a enzima protease produzida por *B. koreensis* pode ser utilizada como biocatalisador alternativo para diversas aplicações industriais.

O outro filo identificado no presente estudo foi *Actinobacteria* com 3 culturas isoladas parcialmente identificadas, sendo duas delas correspondentes ao gênero *Streptomyces* (1LA1 *Streptomyces misionensis strain PDS80* e 3LA18; *Streptomyces andamanensis strain KC-112*) e uma cultura isolada classificada para o gênero *Gordonia* (*Gordonia hongkongensis strain 5-5 16S*)

Actinobacterias, são uma fonte única de compostos bioativos estruturalmente diversos de grande relevância médica e industrial, tal como antibióticos e antitumorais. *Streptomyces* são bactérias onipresentes no solo, com importante papel ecológico (SARMIENTO-VIZCAÍNO et al., 2016).

Algumas espécies do gênero *Streptomyces* evoluíram para viver em simbiose com plantas e animais terrestres e marinhos. Especula-se que a diversidade química de metabólitos secundários produzidos por espécies desse gênero provavelmente evoluiu como um resultado direto de suas interações com outros organismos (SEIPKE et al., 2012).

Embora as espécies de *Streptomyces* tenham sido tradicionalmente consideradas bactérias do solo, nas últimas décadas tornou-se evidente sua presença e ampla distribuição nos ecossistemas oceânicos e há evidências crescentes da presença de *Streptomyces* na atmosfera. A relevância da

atmosfera como uma nova fonte de espécies altamente diversificadas de *Streptomyces* capazes de produzir um incrível reservatório de produtos naturais tem sido negligenciado até agora (SARMIENTO-VIZCAÍNO et al.,2018).

2.5 CONCLUSÃO

A maior parte dos isolados (n=64) dos isolados não foi identificada por sequenciamento 16S e os isolados que foram que foram classificados até o momento, só tiveram parte da sequência ampliada como sucesso. Futuramente serão realizadas mais tentativas de identificação deste isolados para complementação dos resultados deste estudo.

O dendrograma gerado com os MSP dos isolados aliado com as análises de sequenciamento 16S demonstram que a maior parte das culturas capturadas na atmosfera pertencem ao filo *Firmicutes*, o que foi relatado também em outros estudos. Isso indica que nossos resultados para a época amostrada seguem a tendência para estudos de bioaerossóis.

Como apresentado, os filios *Firmicutes* e *Actinobacteria* identificados aqui, possuem relação com os ciclos biogeoquímicos em ambientes naturais, principalmente relacionados aos traços de promoção de crescimento de plantas.

Uma hipótese que pode justificar o grande número de isolados identificados como *B. megaterium*, é de que enquanto este tem capacidade de solubilizar fósforo com maior eficiência que outras espécies, a floresta Amazônica recebe uma carga sazonal de partículas fósforo (e outros minerais) diretamente do deserto do Saara em sua atmosfera, o que deve proporcionar melhores condições de desenvolvimento para esse grupo.

A continuidade da pesquisa para finalização da identificação da biodiversidade da microbiota estudada pode contribuir para a compreensão das relações entre a floresta amazônica e a atmosfera. Da mesma forma sugerimos a realização de mais estudos para melhor compreensão dessas dinâmicas, estudos com monitoramento sazonal de anos e até décadas.

Este estudo também pode futuramente contribuir para o desenvolvimento de bioprodutos, levando em consideração que filios identificados aqui também são reconhecidos por seu potencial para uso biotecnológico.

REFERÊNCIAS

AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; OLSON, R. J.; et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1919–25, 1990. American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2200342>>. Acesso em: 22/5/2019.

ANBU, P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 162–168, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.02.014>>. Acesso em: 2/6/2019.

ANDREAE, M. O.; ACEVEDO, O. C.; ARAÚJO, A.; et al. The Amazon Tall Tower Observatory (ATTO): overview of pilot measurements on ecosystem ecology, meteorology, trace gases, and aerosols. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 15, n. 18, p. 10723–10776, 2015. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/15/10723/2015/>>. Acesso em: 23/5/2019.

BARREIRO, J. R. **Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010. Acesso em: 10/11/2018.

BUDIHARJO, A.; JEONG, H.; WULANDARI, D.; LEE, S.; RYU, C.-M. Complete Genome Sequence of *Bacillus altitudinis* P-10, a Potential Bioprotectant against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Isolated from Rice Rhizosphere in Java, Indonesia. **Genome announcements**, v. 5, n. 48, p. e01388-17, 2017. American Society for Microbiology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29192088>>. Acesso em: 2/6/2019.

TIMPERIO, A. M.; GORRASI, S.; ZOLLA, L.; FENICE, M. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. (J. M. Jacobs, Org.) **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181860, 2017. Public Library of Science. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0181860>>. Acesso em: 28/5/2019.

DIXIT, S. Isolation and Characterization of Rice Endophytic Bacteria, **BLAST NCBI**, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1485818235>>. Acessado em: 02/06/2019.

ESAKKIRAJ, P.; USHA, R.; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Solid-state production of esterase using fish processing wastes by *Bacillus altitudinis* AP-MSU. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 370–376, 2012. Elsevier. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308511001167?via%3Dihub>>. Acesso em: 2/6/2019.

FRÖHLICH-NOWOISKY, J.; KAMPF, C. J.; WEBER, B.; et al. Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. **Atmospheric Research**, v. 182, p. 346–376, 2016. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169809516301995>>. Acesso em: 23/5/2019.

GORBUSHINA, A. A.; KORT, R.; SCHULTE, A.; et al. Life in Darwin's dust: intercontinental transport and survival of microbes in the nineteenth century. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 2911–2922, 2007. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2007.01461.x>>. Acesso em: 2/6/2019.

HALDER, U.; BANERJEE, A.; CHAUDHRY, V.; et al. Draft Genome Report of *Bacillus altitudinis* SORB11, Isolated from the Indian Sector of the Southern Ocean. **Genome announcements**, v. 5, n. 23, 2017. American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28596391>>. Acesso em: 2/6/2019.

GURGATZ, B. Avaliação de material particulado fino, fuligem e poluentes gasosos na região portuária de Paranaguá. Dissertação (Pós-Graduação em Desenvolvimento Territorial Sustentável) — Curitiba - PR: **UFPR**, 2018.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

HUA, N.-P.; KOBAYASHI, F.; IWASAKA, Y.; SHI, G.-Y.; NAGANUMA, T. Detailed identification of desert-originated bacteria carried by Asian dust storms to Japan. **Aerobiologia**, v. 23, n. 4, p. 291–298, 2007. Springer Netherlands. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10453-007-9076-9>>. Acesso em: 2/6/2019.

JEON, E. M.; KIM H. J.; JUNG, K.; et al. Impact of Asian dust events on airborne bacterial community assessed by molecular analyses. **Atmospheric Environment**, v.45, p.4313-4321, 2011. ISSN 1352-2310, <<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.11.054>>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231010010253>>. Acesso em: 02/06/2019.

LANE, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. **Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds.**, John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.

LIU B: BioSeq-Analysis: a platform for DNA, RNA, and protein sequence analysis based on machine learning approaches. **Briefings in Bioinformatics**, DOI: 10.1093/bib/bbx165.

MAKI, T.; HARA, K.; IWATA, A.; et al. Variations in airborne bacterial communities at high altitudes over the Noto Peninsula (Japan) in response to Asian dust events. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 17, n. 19, p. 11877–11897, 2017. Disponível em: <<https://www.atmos-chem-phys.net/17/11877/2017/>>. Acesso em: 23/5/2019.

MORRIS, E. et al. Bioprecipitation: a feedback cycle linking Earth history, ecosystem dynamics and land use through biological ice nucleators in the atmosphere. **Global Change Biology**, [s.l.], v. 20, no 2, p. 341–351, 2013. ISSN: 1354-1013, DOI:[10.1111/gcb.12447](https://doi.org/10.1111/gcb.12447). Acesso em: 23/5/2019.

POLEZER, G. Materiais antropogênicos suspensos na atmosfera de Curitiba. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) —Curitiba - PR: **UFPR**, 2015. Acesso em: 12/11/2018.

SARMIENTO-VIZCAÍNO, A.; BRAÑA, A. F.; GONZÁLEZ, V.; et al. Atmospheric Dispersal of Bioactive *Streptomyces albidoflavus* Strains Among Terrestrial and Marine Environments. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 2, p. 375–386, 2016. Springer US. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00248-015-0654-z>>. Acesso em: 3/6/2019.

SARMIENTO-VIZCAÍNO, A.; ESPADAS, J.; MARTÍN, J.; et al. Atmospheric Precipitations, Hailstone and Rainwater, as a Novel Source of *Streptomyces* Producing Bioactive Natural Products. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 773, 2018. Frontiers. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00773/full>>. Acesso em: 3/6/2019.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. **Genome Biology**, v. 6, n. 8, p. 229, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1273625/>>.

SHIVAJI, S.; CHATURVEDI, P.; SURESH, K.; et al. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 56, n. 7, p. 1465–1473, 2006. Microbiology Society. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.64029-0>>. Acesso em: 2/6/2019.

SMITH, D. J.; JAFFE, D. A.; BIRMELE, M. N.; et al. Free Tropospheric Transport of Microorganisms from Asia to North America. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 4, p. 973–985, 2012. Springer-Verlag. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00248-012-0088-9>>. Acesso em: 23/5/2019.

SMITH, D. J.; TIMONEN, H. J.; JAFFE, D. A.; et al. Intercontinental dispersal of bacteria and archaea by transpacific winds. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1134–9, 2013. American Society for Microbiology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220959>>. Acesso em: 2/6/2019.

SUNAR, K.; DEY, P.; CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 91–104, 2015. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.201300227>>. Acesso em: 2/6/2019.

SEIPKE, R. F.; KALTENPOTH, M.; HUTCHINGS, M. I. Streptomyces as symbionts: An emerging and widespread theme? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 862–876, 2012. Narnia. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00313.x>>. Acesso em: 3/6/2019.

SUNI, T.; GUENTHER, A.; HANSSON, H. C.; et al. The significance of land-atmosphere interactions in the Earth system—iLEAPS achievements and perspectives. **Anthropocene**, v. 12, p. 69–84, 2015. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213305415300254>>. Acesso em: 23/5/2019.

TIMPERIO, A. M.; GORRASI, S.; ZOLLA, L.; FENICE, M. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. (J. M. Jacobs, Org.) **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181860, 2017. Public Library of Science. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0181860>>. Acesso em: 28/5/2019.

ULTEE, A.; SOUVATZI, N.; MANIADI, K.; KONIG, H. Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 560–568, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2004.02174.x>>. .

VIJAY KUMAR, E.; SRIJANA, M.; KIRAN KUMAR, K.; HARIKRISHNA, N.; REDDY, G. A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 4, p. 403–409, 2011. Springer-Verlag. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00449-010-0483-x>>. Acesso em: 2/6/2019.

WADE, W. Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 95, n. 2, p. 81–83, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1279316/>>. Acesso em: 2/6/2019.

YAO, M. Bioaerosol: A bridge and opportunity for many scientific research fields. **Journal of Aerosol Science**, v. 115, p. 108–112, 2018. Pergamon. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021850217302999>>. Acesso em: 23/5/2019.

ZHAI, Y.; LI, X.; WANG, T.; et al. A review on airborne microorganisms in particulate matters: Composition, characteristics and influence factors. **Environment International**, v. 113, p. 74–90, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29421410>>. Acesso em: 10/10/2018.

ZHENG, B.-X.; IBRAHIM, M.; ZHANG, D.-P.; et al. Identification and characterization of inorganic-phosphate-solubilizing bacteria from agricultural fields with a rapid isolation method. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 47, 2018. Springer. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29589217>>. Acesso em: 2/6/2019.

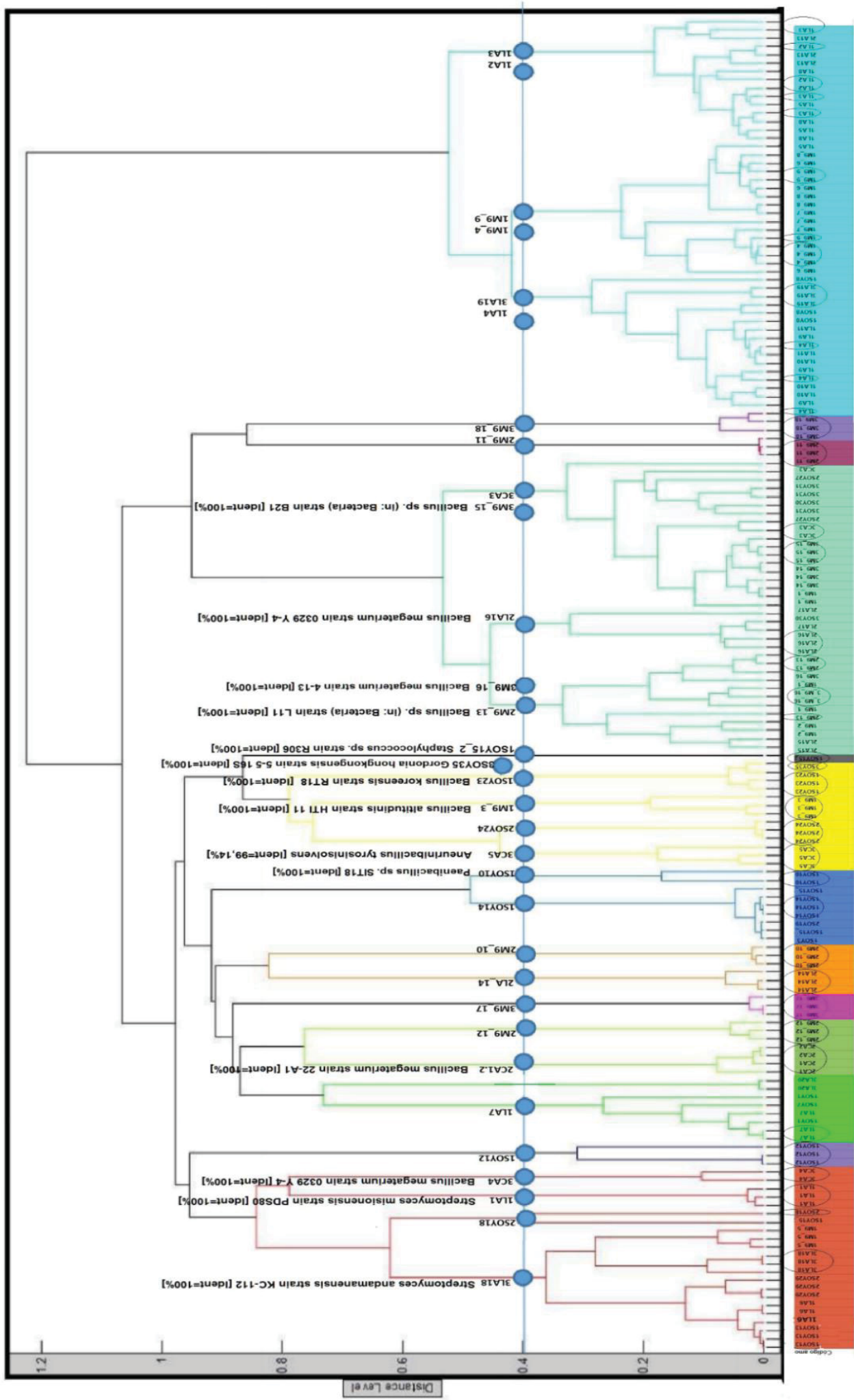
ANEXO 1 – DATA E HORARIO DE COLETA

AMOSTRADOR	CÓDIGO AMOSTRA	PERÍODO AMOSTRADO	Instalação da amostra	Retirada da amostra	TOTAL (HORAS)
1	1-1	19/08/2018 - 20/08/2018	09:00	09:00	24'
1	1-2	20/08/2018 - 23/08/2018	10:00	09:38	71' 38"
1	1-3	23/08/2018 - 26/08/2018	10:30	11:30	73'
2	2-1	19/08/2018 - 20/08/2018	09:00	09:00	24'
2	2-2	20/08/2018 - 21/08/2018	10:00	10:00	24'
2	2-3	21/08/2018 - 22/08/2018	10:00	10:07	24' 07"
2	2-4	22/08/2018 - 23/08/2018	10:45	09:38	23' 53"
2	2-5	23/08/2018 - 24/08/2018	10:33	10:15	23' 42"
2	2-6	24/08/2018 - 25/08/2018	10:55	10:43	23' 48"
2	2-7	25/08/2018 - 26/08/2018	11:30	11:30	24'
3	3-1	19/08/2018 - 20/08/2018	09:00	09:00	24'
3	3-2	20/08/2018 - 21/08/2018	10:00	10:00	24'
3	3-3	21/08/2018 - 22/08/2018	10:00	10:07	24' 07"
3	3-4	22/08/2018 - 23/08/2018	10:45	09:38	23' 53"
3	3-5	23/08/2018 - 24/08/2018	10:33	10:15	23' 42"
3	3-6	24/08/2018 - 25/08/2018	10:55	10:43	23' 48"
3	3-7	25/08/2018 - 26/08/2018	11:30	11:30	24'
1	Controle negativo 1	Não amostrado	---	---	0'
2	Controle negativo 2	Não amostrado	---	---	0'
3	Controle negativo 3	Não amostrado	---	---	0'

**ANEXO 2 – MONITORAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DE
COLÔNIAS**

Meio Amostra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	Meio Amostra	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
L.A						Tryptone Soy					
LA_B	0	0	0	0	0	SOY_B	0	0	0	0	0
LA_Bd	0	0	0	0	0	SOY_Bd	0	0	0	0	0
LA_1-1	0	0	0	3	5	SOY_1-1	0	0	2	2	7
LA_1-1d	0	0	0	3	6	SOY_1-1d	0	0	3	5	11
LA_2-1	0	0	0	1	1	SOY_2-1	0	0	0	1	4
LA_2-1d	0	0	0	0	1	SOY_2-1d	0	1	1	2	2
LA_3-1	0	0	0	0	0	SOY_3-1	0	1	1	1	1
LA_3-1d	0	0	0	0	0	SOY_3-1d	0	2	2	2	2
LA_2-7	0	0	0	1	1	SOY_2-7	0	3	5	5	3
LA_2-7d	2	2	2	2	3	SOY_2-7d	0	1	1	1	2
LA_3-7	0	0	1	1	1	SOY_3-7	0	1	2	2	2
LA_3-7d	0	0	0	1	2	SOY_3-7d	0	1	1	1	1
Citrate Agar						M9					
CA_B	0	0	0	0	0	M9_B	0	0	0	0	0
CA_Bd	0	0	0	0	0	M9_Bd	0	0	0	0	0
CA_1-1	0	0	0	0	0	M9_1-1	3	3	6	6	6
CA_1-1d	0	0	0	0	0	M9_1-1d	0	0	1	3	3
CA_2-1	0	0	0	0	0	M9_2-1	0	0	0	1	1
CA_2-1d	0	0	+	+	+	M9_2-1d	0	0	0	0	1
CA_3-1	1	0	1	1	1	M9_3-1	1	+	+	+	+
CA_3-1d	0	0	0	0	0	M9_3-1d	0	0	0	0	0
CA_2-7	0	0	0	0	0	M9_2-7	0	0	0	1	1
CA_2-7d	0	0	0	0	0	M9_2-7d	0	0	1	1	1
CA_3-7	1	1	2	2	2	M9_3-7	2	2	2	2	3
CA_3-7d	0	0	0	0	0	M9_3-7d	2	2	3	3	3

ANEXO 3 – DENDROGRAMA DOS PERFIS PROTEICOS DA PRIMEIRA BATERIA DE ANÁLISE EM MALDI-TOF



3 CAPÍTULO III

UNCOVERING PROKARYOTIC BIODIVERSITY WITHIN AEROSOLS OF THE PRISTINE AMAZON FOREST

Felipe F. C. Souza¹, Daniel V. Rissi², Fabio O. Pedrosa^{3,4}, Emanuel M. Souza^{3,4}, Valter A. Baura⁴,
Rose A. Monteiro⁴, Eduardo Balsanelli⁴, Leonardo M. Cruz^{3,4}, Rodrigo A. F. Souza⁵, Meinrat O.
Andreae⁷, Rodrigo A. Reis¹, Ricardo H. M. Godoi⁶, Luciano F. Huergo^{1,3,4*}.

- 1- Setor Litoral, UFPR, Matinhos, PR, Brazil
- 2- Department of Livestock Microbial Ecology, Institute of Animal Science, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany
- 3- Programa de pós-graduação em Bioinformática, SEPTI, UFPR, Curitiba, PR, Brazil
- 4- Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, Curitiba, PR, Brazil.
- 5- Meteorology Department, State University of Amazonas – UEA, Manaus, AM, Brazil
- 6- Departamento de Engenharia Ambiental, UFPR, Curitiba, PR, Brazil.
- 7- Max Planck Institute for Chemistry, Mainz, Germany

*Correspondence to: Luciano F. Huergo, Tel: +55 41 33611570, E-mail: huergo@ufpr.br Tel.

+55 41 996765856. Fax. +55 41 33161570.

Running title: bioaerosol amazon microbiome

Key words: bioaerosol, Amazon, biodiversity, 16S sequencing, metagenome

Abstract

Biological aerosols (bioaerosol) are atmospheric particles that act as a dispersion unit of living organisms across the globe thereby affecting the biogeographic distribution of organisms. . Despite their importance, there is virtually no knowledge about bioaerosols emitted by pristine forests. Here we provide the very first survey of the prokaryotic community of a bioaerosol collected inside pristine Amazon forest at 2 m above ground. Total atmospheric particles were collected at the Amazon Tall Tower Observatory, subjected to metagenomic DNA extraction and the prokaryotic diversity was determined by 16S rRNA gene amplicon sequencing. A total of 271,577 reads of 250bp of the 16S rRNA gene amplicon were obtained. Only 27% of the reads could be classified using the 16S SILVA database. Most belonged to Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes which is in good agreement with other bioaerosol studies. Manual inspection of the unclassified reads using Blast searches revealed that most of the sequences belong to Fungal sequences including ITS, genomic or mitochondrial ribosomal 18S or 16S and rRNA genes, respectively. The identified microbes suggest that the atmosphere may act as an important gateway to interchange bacteria between plants, soil and water ecosystems.

Introduction

The Amazon Rainforest is the largest tropical forest in the world, and this biome hosts a significant portion of the earth's biodiversity. Despite the well-studied diversity of plants and animals, there are just a few studies analysing prokaryotic biodiversity in the Amazon, and these studies focused mainly on soil (Fonseca *et al.* 2018) and freshwater ecosystems in rivers and lakes (Ghai *et al.* 2011; Santos-Júnior *et al.* 2016).

Molecular approaches combining environmental metagenomic DNA extraction, 16S rRNA gene sequencing and bioinformatics are helping to uncover environmental prokaryotic communities. The Earth Microbiome project has catalogued microbial communities on a global scale with efforts concentrated on soil, sediments, water and animals or plant material (Thompson *et al.* 2017).

Cataloguing and comprehending the diversity and ecology of prokaryotic life in biogenic aerosols (bioaerosol) is key to understanding the biogeographic distribution of these organisms. Increasing evidence supports the hypothesis that bioaerosols may affect the climate system by acting as ice nuclei and/or cloud condensation nuclei (Hawke *et al.* 2010). Furthermore, bioaerosols may act as a vehicle to spread disease (Womack, Bohannan and Green 2010). Much of the literature on bioaerosols was focused on urban and or closed environments with emphasis on medical microbiology (Robertson *et al.* 2013). Very few studies reported the diversity of bacteria in aerosols sampled in open environments (Mayol *et al.* 2017; Yoo *et al.* 2017). To our knowledge, there is no data on the Bacterial biodiversity of pristine forest aerosol. Here we describe the first survey of the prokaryotic diversity within bioaerosols inside pristine Amazon forest.

Material and methods

Air samples were collected at the Amazon Tall Tower Observatory (ATTO) (Andreae *et al.* 2015), set up in a pristine rain forest region in the central Amazon Basin, about 150 km northeast of the city of Manaus. Adapted Harvard inertial impactor samplers were used to collect total particulate matter were set 2m above ground Polycarbonate filters (0.8 μ m cut off) were assembled in their holders and sterilized at 120° C for 20 min. The filters were placed in sterile petri dishes which were sealed under vacuum and were opened only at the time of sampling. Other parts of the Harvard sampler were, extensively washed, disinfected by rising with ethanol 70% (v/v) and exposing to a UV lamp for 5 min inside a microbiological chamber. The Harvard apparatus and filters were mounted, and air flow was achieved using a pump operating at 35 l.min⁻¹. After 72h of sampling, the filters were collected with sterilized tweezers, placed inside sterile disposable petri dishes, sealed under vacuum and kept at approximately 4°C until extraction of DNA (between 3 to 10 days). Two filters that were used as negative controls were installed inside the Harvard samplers and left for 30 min without airflow.

Two filters were sampled for 72h (Between 20 and 26 August, 2018, during the dry season, During all sampling time, the average humidity was 75% and the wind speed smaller than 1m.s⁻¹). The filters were combined, cut in small pieces using sterile scissors and processed using the DNA extraction kit DNeasy Power Water (QIAGEN). The DNA was extracted following the manufacture's protocol with the addition of a 30 min sonication step in a water bath at 65° C before cell rupture. According, to previous studies, this step increases the yield of metagenomic DNA recovered from bioaerosol filters (Luhung *et al.* 2015). The two negative control filters were subjected to exactly the same extraction protocol.

All the recovered metagenomic DNA was used as template for PCR amplification of the 16S rRNA gene V4 region. PCR, barcoding and Illumina sequencing was performed as described previously (Caporaso *et al.* 2012; Huergo *et al.* 2018). Amplicons were verified by electrophoresis and quantified by Qubit HS dsDNA kit (Invitrogen). Negative control samples underwent exactly the same PCR conditions and did not produce amplicons as verified by electrophoresis. Sequencing reactions were performed for each sample using a MiSeq platform with MiSeq 300v2 Reagent Kit (Illumina).

The sequences were quality analysed using the Fastqc tool. The forward sequences were processed using QUIIME v1.9 (Kuczynski *et al.* 2012), Uchime 6.1 was used for detection of chimeras but no chimeras were detected. The OTUs were picked and clustered with Uclust 1.2.21 at 97% sequence identity. Taxonomy classification was performed using the SILVA database 132 using 97% identity cut off (Quast *et al.* 2013) and the RDP classifier tool using 80 bootstrap confidence cut off (Wang *et al.* 2007). Sequences were deposited at Genbank Bioproject PRJNA528294 / SRR8799441).

Results and Discussion

In order to establish the prokaryotic community present in bioaerosols of pristine Amazon forest we used adapted Harvard inertial impactor samplers to collect total particulate matter at the Amazon Tall Tower Observatory. Total metagenomic DNA was extracted and used as template for 16S rRNA gene amplicon sequencing. Parallel controls with blank filters were processed exactly as the sampled filters but yield no 16S amplicons. Hence, supporting that sequences obtained are not result of spurious contamination.

A total of 271,577 reads of 250bp of the 16S rRNA gene amplicon were obtained. The reads were clustered at 97% sequence identity into Operational Taxonomic Units (OTUs) resulting in 4,296 OTUs. Rarefaction plots are shown in Fig. S1. OTUs were subjected to taxonomy classification using the SILVA database 132 (Quast *et al.* 2013). Only 27% of the reads

could be classified using the 16S database. Most of the OTUs classified as bacteria belonged to the phyla Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes (Fig. S2) which is in good agreement with other bioaerosol studies (Archer *et al.*, 2019; Tanaka *et al.*, 2019).

The taxonomic identity of each of the sequence reads was explored using the RDP classifier tool (Wang *et al.* 2007) and the RDP 16S database (accessed in February 2019). This approach classified 38,281 reads (14%) at the Phylum level. Only 6 reads were representative of Archaea, the remaining were mostly Proteobacteria 36%, Actinobacteria 24% and Firmicutes 19% (Fig. 1A). The most prevailing classified Bacterial Order, Classes and Families are depicted in Fig. 1. The most representative Families were Bacillaceae 13%, Xanthomonadaceae 9%, Streptomycetaceae 7%, Sphingobacteriaceae 6%, Microbacteriaceae 5% and Enterobacteriaceae 5%. The most prevailing reads classified at the genus level are depicted in Fig. 2 and Table S1.

We were intrigued by the fact that only a small fraction of the reads could be classified using the 16S rRNA sequence databases SILVA or RDP. Manual inspection of the unclassified reads using Blast searches revealed that most of the sequences belong to Fungal sequences including ITS, mitochondrial and genomic ribosomal 16S and 18S rRNA genes, respectively. Indeed, nearly all the OTUs that could not be classified using the prokaryotic 16S SILVA database were properly classified using the fungal SILVA database (Fig. S3). The prevailing fungi were Basidiomycota, Ascomycota and (Fig. S3) which is in good agreement with data in other bioaerosol studies (Tanaka *et al.*, 2019)

It is well known that 16S rDNA primer pairs also exhibit high affinity for plastid and mitochondrial DNA and it is common to detect a small fraction of eukaryotic mitochondrial DNA amplicons in 16S amplicon studies (Beckers *et al.* 2016). In our study, most of the reads obtained were from Fungal related sequences (Fig. S3) suggesting that Fungal abundance overcomes Prokaryotic abundance in the biogenic aerosol inside Amazon.

Conclusions

One of the major challenges to study bioaerosol composition is the lack of standard methods and the low yield of biomass per volume of air (Luhung *et al.* 2015). The data reported exemplifies a successful analysis of forest bioaerosol using a metagenomics approach which can be used as a framework for more complex ecological studies in the future. Our data uncovers, for the first time, the prokaryotic communities within aerosols collected inside the Amazon forest.

The identified Bacterial genera (Fig. 2 and Table S1) included mostly cosmopolitan taxa, there was also evidence of the presence of bacterial taxa with more defined niches such as: soil (i.e. *Streptomyces*, 579 reads); rhizosphere (i.e. *Bradyrhizobium*, 45 reads and *Azospirillum*, 17 reads); and water (i.e. *Oceanobacillus*, 45 reads). Hence, these data suggest that the atmosphere may act as an important gateway for the interchange of bacteria between plants, soil and water sources.

This study revealed that a significant fraction of the organisms present in Amazon forest bioaerosols are spore forming saprophyte organisms such as Fungi and Bacteria such as *Streptomyces* and *Bacillus*, organisms that are known to disperse their spores through the atmosphere. These group of organisms are known to produce a range of hydrolytic enzymes and secondary metabolites including antibiotics. Hence, forest aerosol may be an interesting source for the prospection of organisms for biotechnological applications.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support of INCT Fixação Biológica de Nitrogênio, Fundação Araucária, FINEP, CAPES and CNPq and the logistical support from LBA, INPA and UEA. We are also grateful to the Max Planck Society, the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF contract 01LB1001A), the Brazilian Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI/FINEP contract 01.11.01248.00), FAPEAM, and SDS/CEUC/RDS-Uatumã. We are grateful to Prof. Ray Dixon – John Innes Centre – UK, for revising the manuscript.

References

- Andreae MO, Acevedo OC, Araùjo A *et al.* The Amazon Tall Tower Observatory (ATTO): Overview of pilot measurements on ecosystem ecology, meteorology, trace gases, and aerosols. *Atmos Chem Phys* 2015, DOI: 10.5194/acp-15-10723-2015.
- Archer SDJ, Lee KC, Caruso T, Maki T, Lee CK, Cary SC, Cowan DA, Maestre FT, Pointing SB. Airborne microbial transport limitation to isolated Antarctic soil habitats. *Nature Microbiology* 2019, DOI: 10.1038/s41564-019-0370-4
- Beckers B, Op De Beeck M, Thijs S *et al.* Performance of 16s rDNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies. *Front Microbiol* 2016, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00650.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012, DOI: 10.1038/ismej.2012.8.
- Fonseca JP, Hoffmann L, Cabral BCA *et al.* Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve. *Gene* 2018, DOI: 10.1016/j.gene.2017.11.039.
- Ghai R, Rodríguez-Valera F, McMahon KD *et al.* Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. *PLoS One* 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0023785.
- Huergo LF, Rissi D V., Elias AS *et al.* Influence of ancient anthropogenic activities on the mangrove soil microbiome. *Sci Total Environ* 2018, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.094.

- Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA *et al.* Using QIIME to analyze 16s rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Microbiol* 2012, DOI: 10.1002/9780471729259.mc01e05s27.
- Luhung I, Wu Y, Ng CK *et al.* Protocol improvements for low concentration DNA-based bioaerosol sampling and analysis. *PLoS One* 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0141158.
- Mayol E, Arrieta JM, Jiménez MA *et al.* Long-range transport of airborne microbes over the global tropical and subtropical ocean. *Nat Commun* 2017, DOI: 10.1038/s41467-017-00110-9.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013, DOI: 10.1093/nar/gks1219.
- Robertson CE, Baumgartner LK, Harris JK *et al.* Culture-independent analysis of aerosol microbiology in a metropolitan subway system. *Appl Environ Microbiol* 2013, DOI: 10.1128/AEM.00331-13.
- Santos-Júnior CD, Henrique-Silva F, de Oliveira TCS *et al.* Metagenomics Analysis of Microorganisms in Freshwater Lakes of the Amazon Basin. *Genome Announc* 2016, DOI: 10.1128/genomea.01440-16.
- Tanaka D, Sato K, Goto M, Fujiyoshi S, Maruyama F, Takato S, Shimada T, Sakatoku A, Aoki K, Nakamura S. Airborne Microbial Communities at High-Altitude and Suburban Sites in Toyama, Japan Suggest a New Perspective for Bioprospecting. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2019, DOI=10.3389/fbioe.2019.00012.
- Thompson LR, Sanders JG, McDonald D *et al.* A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 2017, DOI: 10.1038/nature24621.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM *et al.* Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007, DOI:

10.1128/AEM.00062-07.

Womack AM, Bohannan BJM, Green JL. Biodiversity and biogeography of the atmosphere.

Philos Trans R Soc B Biol Sci 2010, DOI: 10.1098/rstb.2010.0283.

Yoo K, Lee TK, Choi EJ *et al.* Molecular approaches for the detection and monitoring of microbial communities in bioaerosols: A review. *J Environ Sci (China)* 2017, DOI:

10.1016/j.jes.2016.07.002.

ANNEX

Figure 1. Taxonomic classification at Phylum level

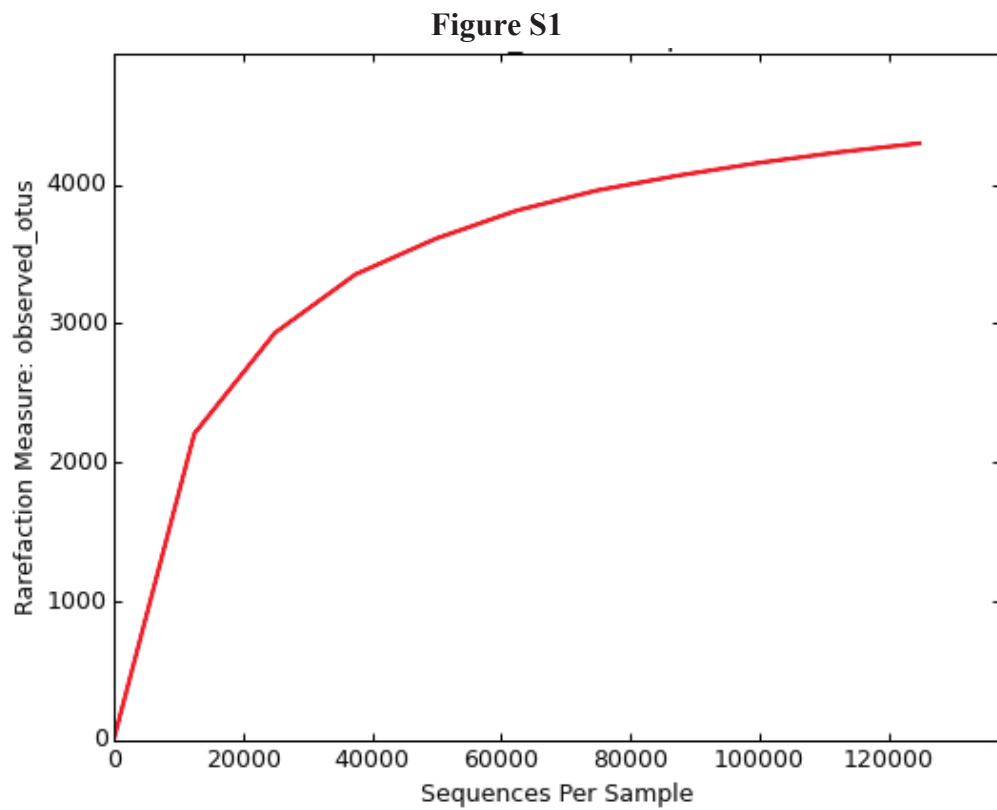


Figure S1. Rarefaction plots of the sample. The clustered OTUs were used to create the rarefaction using QIIME 1.9.

Figure 1. Taxonomic classification at Phylum level

Figure 1

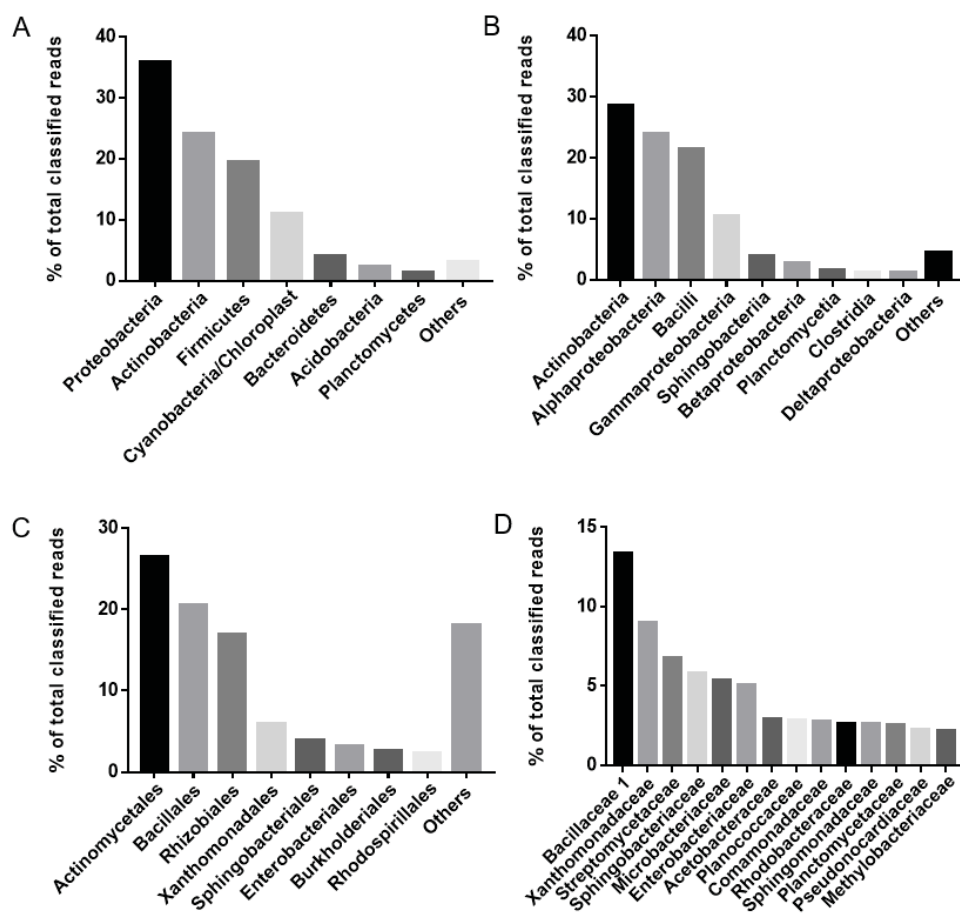


Figure 1. Taxonomic classification at Phylum level (A), Order (B), Class (C) and Family (D). The reads were classified using the RDP classifier with bootstrap cut off 80%. The most prevalent taxa are show as % of total classified reads at each taxonomic level. Reads assigned to chloroplast were removed from the analysis to generate figures B, C and D.

Figure 2. Taxonomic classification of the reads at Genus level

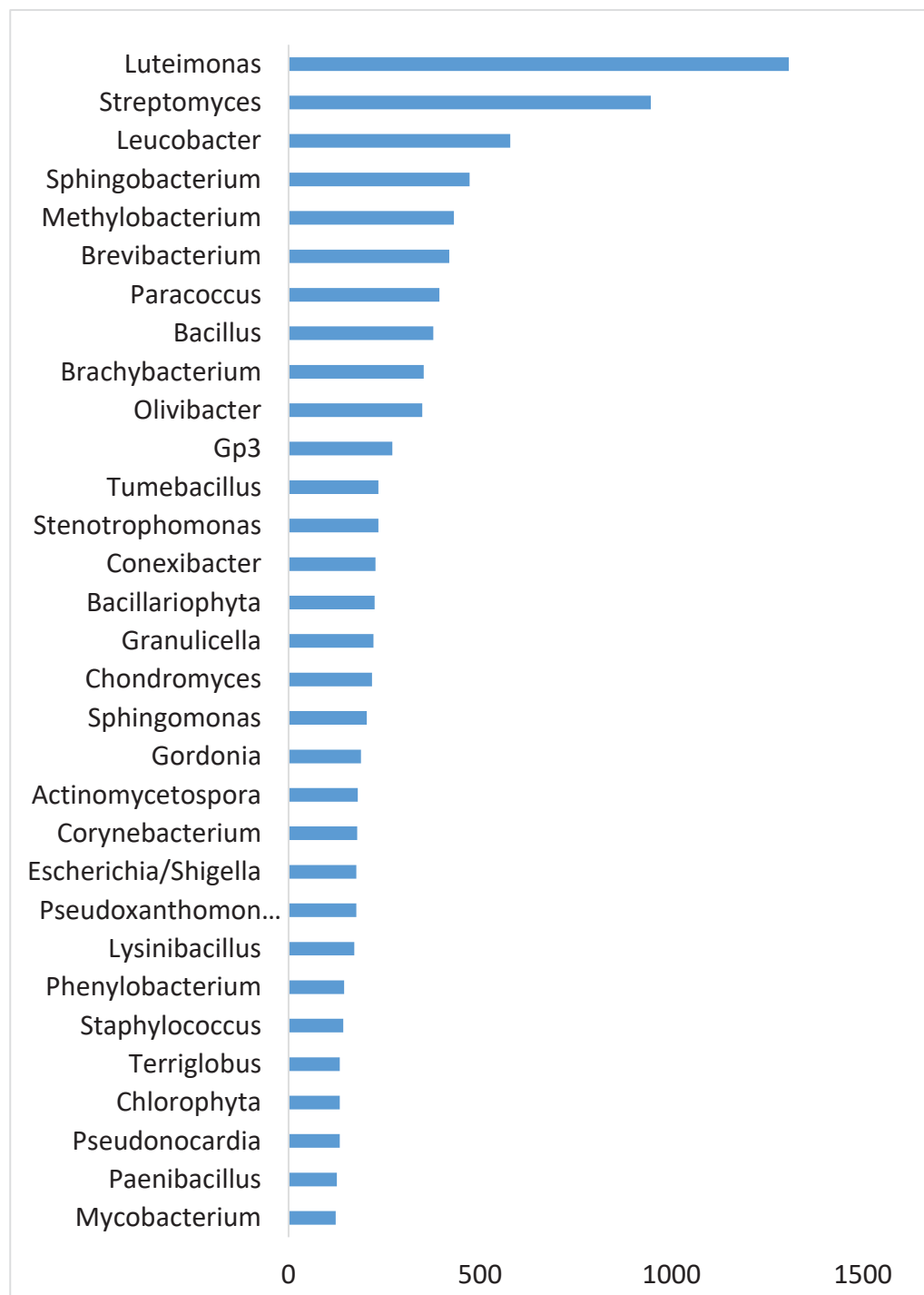


Figure 2. Taxonomic classification of the reads at Genus level. The most prevalent Genus are shown as number of total reads. The plant/chloroplast genus Streptophyta was removed from this analysis

Figure S2. Composition of the prokaryotic community

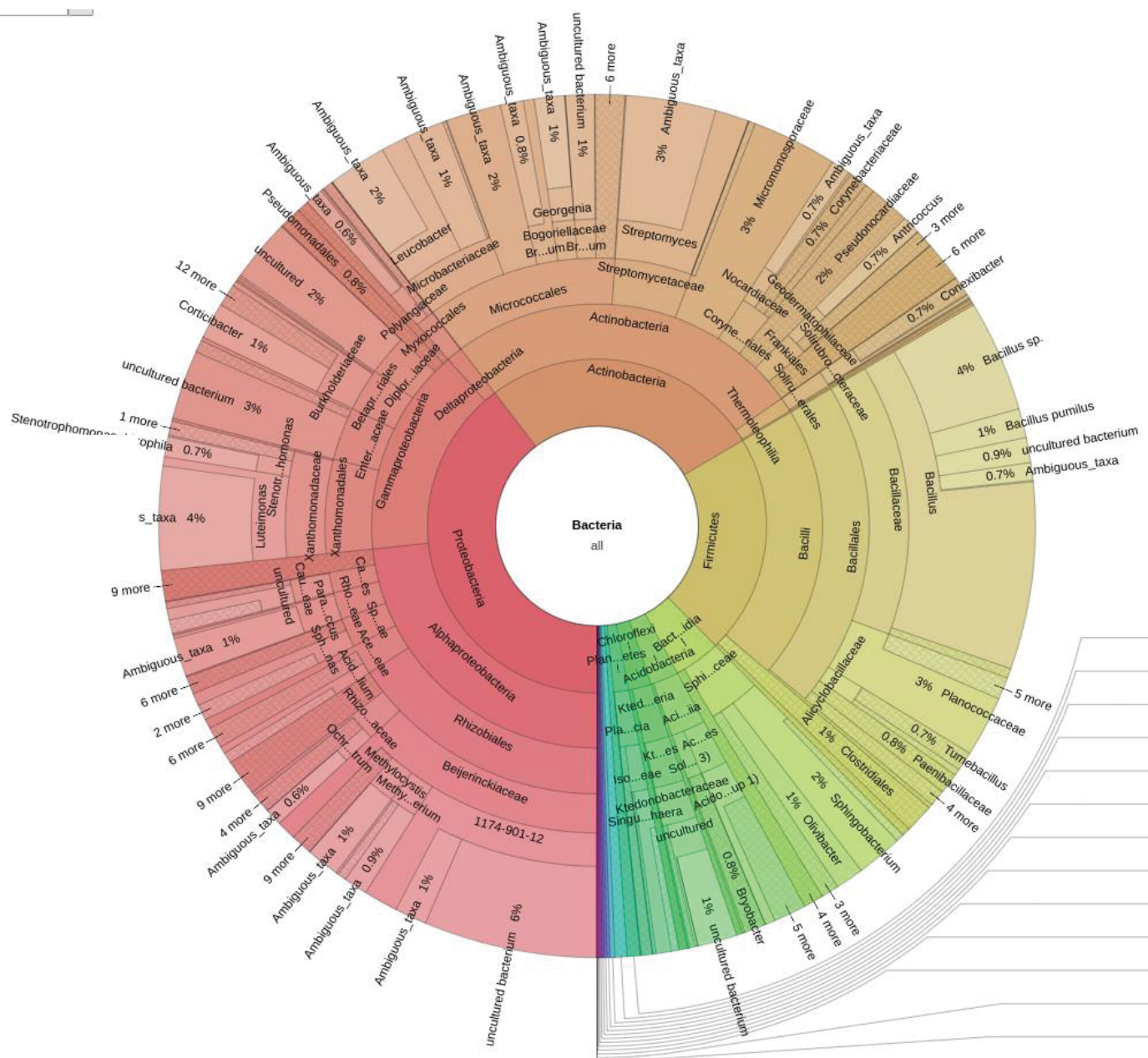


Figure S2. Composition of the prokaryotic community. The OTUs clusters were subjected to taxonomic classification using the Silva 16S database v.132. Graphics were generated using Krona.

Figure S3. Classification of the reads using 18S SILVA database

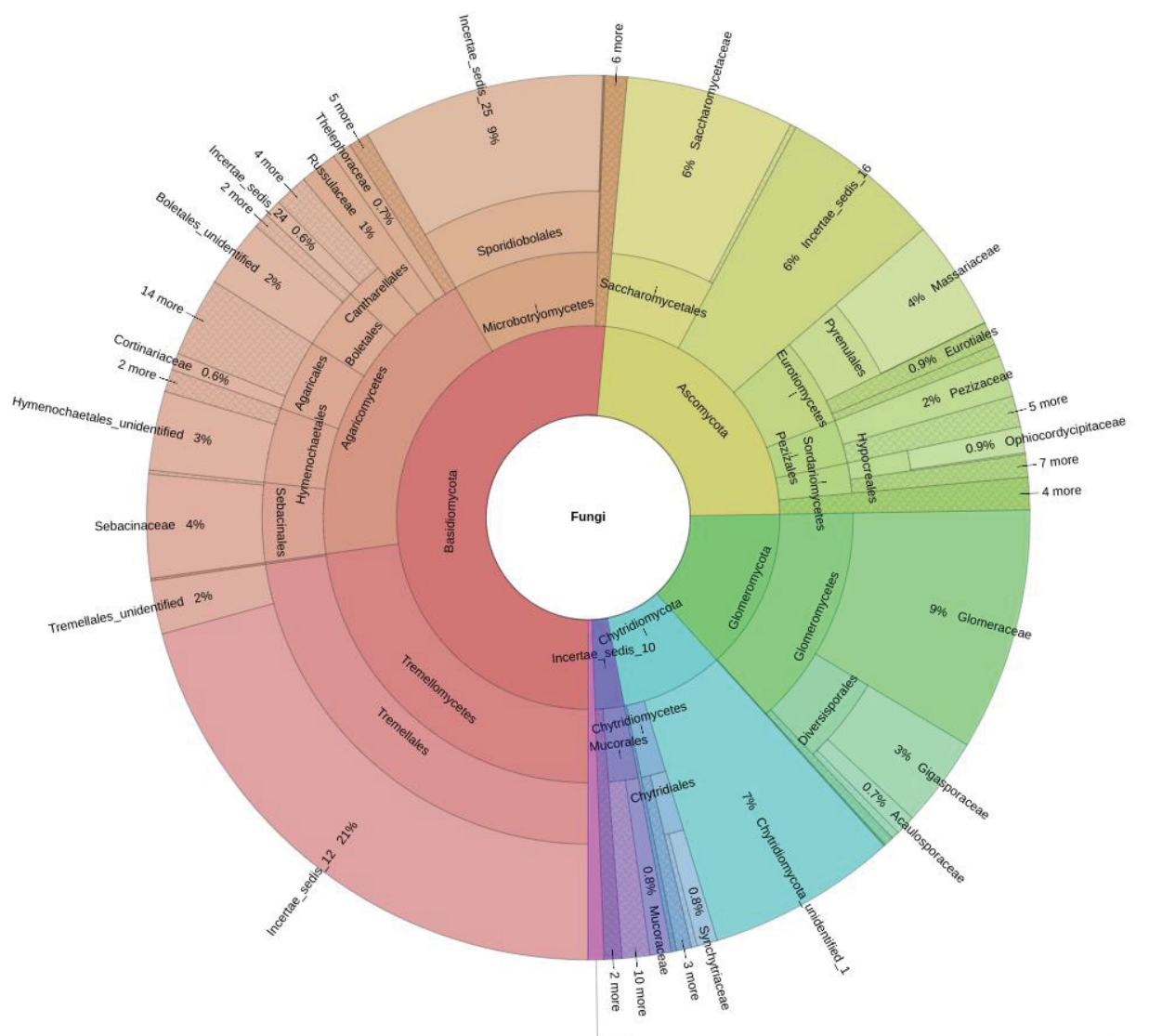


Figure S3. Classification of the reads using 18S SILVA database. All the OTUs that were not assigned using the SILVA 16S database were subjected to taxonomic classification using the SILVA 18S database 132 version . Graphics were generated using Krona.

4 CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Importante salientar que o presente trabalho apresentou os resultados iniciais da pesquisa para identificação da biodiversidade procariótica presente nos bioaerossóis de uma região prístina da floresta amazônica, no Observatório da Torre Alta da Amazônia, no Amazonas. O ANEXO 1, do capítulo II apresenta todas as amostras realizadas durante a campanha de coleta, os resultados restantes serão apresentados assim que estiverem prontos para publicação em periódicos, e prometem informações relevantes para a identificação da alfa e beta diversidade além de informações para os estudos sobre as dinâmicas biogeoquímicas local.

Realizamos adaptações nos amostradores impactador inercial de Harvard para coletar o material particulado total. Não há relatos na literatura sobre o uso destes amostradores com as vazões que utilizamos e as adaptações realizadas para a coleta de bioaerossóis. Porém, a comparação do protocolo inédito utilizado neste trabalho comparado a outros estudos apresentados, tanto para microrganismos cultiváveis, quanto para metagenômico, mostrou-se condizente com os resultados relatados, prova de que a estratégia de pesquisa foi eficaz.

Para as duas estratégias de identificação utilizada, os filtros utilizados como controle negativo não resultaram no desenvolvimento de culturas durante o cultivo, nem em amplificação de material metagenômico, o que indica que não houve contaminação em nenhuma das etapas do estudo.

Como apresentado, o cultivo de microrganismos tem suas vantagens e desvantagens, entretanto o cultivo aliado a técnica de análise metagenômica potencializa os resultados do estudo.

Na análise metagenômica, entre as sequências identificadas para o nível de família, as mais representativas foram: *Bacillaceae* (13%), *Xanthomonadaceae* (9%), *Streptomyetaceae* (7%), *Sphingobacteriaceae* (6%), *Microbacteriaceae* (5%) e *Enterobacteriaceae* (5%). Enquanto as famílias identificadas por cultivo celular foram: *Bacillaceae* (8), *Paenibacillaceae* (2), *Streptomyetaceae* (2), *Staphylococcaceae* (1) e *Gordoniaceae* (1).

Os filios identificados aqui, possuem relação principalmente relacionados as características de promoção de crescimento de plantas, já que muitos deles possuem organismos considerados saprófitos e/ou endófitos. A maior parte das culturas isoladas foram classificados como *B. megaterium*, que possui capacidade de solubilizar fósforo, sendo que a floresta Amazônia recebe uma carga sazonal de partículas fósforo diretamente do deserto do Saara em sua atmosfera, o que deve proporcionar melhores condições de desenvolvimento para esse grupo.

Uma fração significativa de OTUs que não puderam ser classificadas usando o banco de dados procariótico 16S SILVA foram devidamente classificadas usando o banco de dados fúngico SILVA, sugerindo que a abundância de fungos supera a abundância procariótica no aerossol biogênico dentro da Amazônia.

Nossos dados revelam, pela primeira vez, as comunidades procarióticas de aerossóis coletados dentro da floresta amazônica. Este estudo revelou que uma fração significativa dos organismos presentes nos bioaerossóis da floresta amazônica são esporos de microrganismos saprófitos, como fungos e bactérias, como *Streptomyces* e *Bacillus*, organismos que possuem a capacidade de esporulação.

Sabe-se que esse grupo de organismos produz uma variedade de enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários, incluindo antibióticos. Sendo assim, o microbioma atmosférico e bioaerossóis podem ser uma fonte interessante para a prospecção de organismos para aplicações biotecnológicas.