

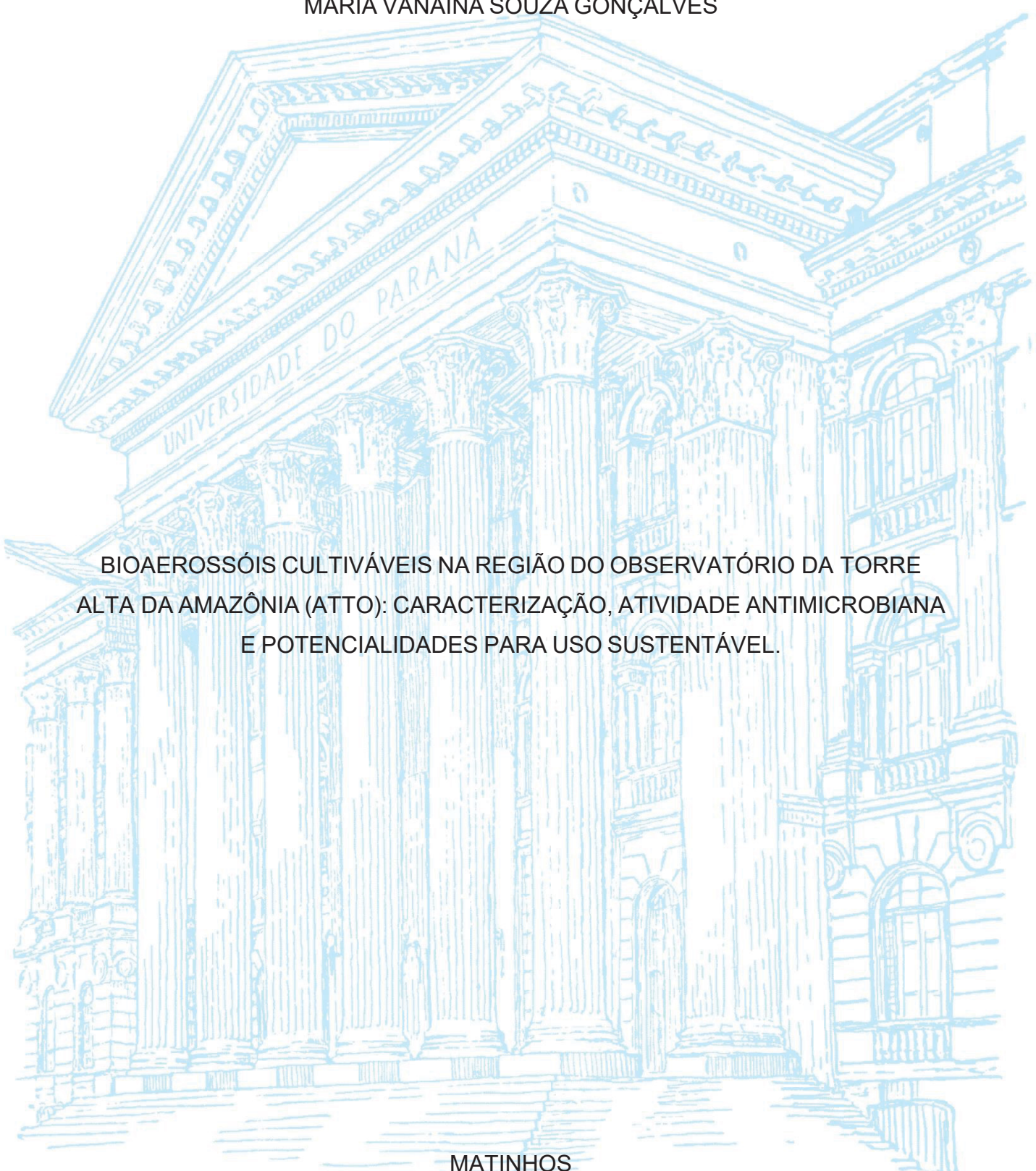
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA VANAINA SOUZA GONÇALVES

BIOAEROSSÓIS CULTIVÁVEIS NA REGIÃO DO OBSERVATÓRIO DA TORRE
ALTA DA AMAZÔNIA (ATTO): CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
E POTENCIALIDADES PARA USO SUSTENTÁVEL.

MATINHOS

2023



MARIA VANAINA SOUZA GONÇALVES

BIOAEROSSÓIS CULTIVÁVEIS NA REGIÃO DO OBSERVATÓRIO DA TORRE
ALTA DA AMAZÔNIA (ATTO): CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
E POTENCIALIDADES PARA USO SUSTENTÁVEL.

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Everson da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

MATINHOS

2023

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

G635 Gonçalves, Maria Vanaina Souza
 Bioaerossóis cultiváveis na região do observatório da torre alta da amazônia (atto):
 caracterização, atividade antimicrobiana e potencialidades para uso sustentável /
 Maria Vanaina Souza Gonçalves ; orientador Luiz Everson da Silva. – 2023
 109 f.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná - Setor Litoral,
 Matinhos/PR, 2023.

 1. Bioaerosol. 2. Atto – Torre Alta da Amazônia. 3. Sustentabilidade. I. Dissertação
 (Mestrado) – Programa de Mestrado em Desenvolvimento Territorial Sustentável. II.
 Título.

CDD – 333.7



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 DESENVOLVIMENTO TERRITORIAL SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIA VANAINA SOUZA GONÇALVES** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DE BIOAEROSSÓIS CULTIVÁVEIS TRANSPORTADOS PELO AR EM ESTAÇÃO SECA E CHUVOSA, NO OBSERVATÓRIO DA TORRE ALTA DA AMAZÔNIA: POTENCIALIDADES PARA O USO SUSTENTÁVEL.**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ EVERSON DA SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 30 de Junho de 2023.

Assinatura Eletrônica

20/07/2023 14:35:32.0

LUIZ EVERSON DA SILVA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

24/08/2023 11:37:20.0

JOSIANE APARECIDA GOMES FIGUEIREDO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/07/2023 22:31:59.0

JULIANA QUADROS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico ao meu Senhor, fonte da minha força e refúgio nos dias de angústia. E ao meu esposo por todo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Senhor Deus por me conceder sabedoria, iluminar o meu caminho, guiar as minhas escolhas, e me fortalecer nos dias difíceis.

Agradeço aos meus irmãos e familiares por todo apoio durante minha trajetória acadêmica. Agradeço especialmente os meus pais por todo cuidado, amor empregado, esforço dedicado, preocupações e apoio ilimitado. Agradeço por todo sacrifício e renúncias feitas, não só por mim, mas por toda nossa família. A vocês meus eternos agradecimentos.

Agradeço ao meu esposo Peterson Cardoso por todo carinho e amor recebido, pelo total apoio aos meus sonhos, por ser meu maior incentivador e por estar ao meu lado nas horas difíceis de desânimo e cansaço, me lembrando nesses momentos que sou filha de um Deus amado e que eu jamais estarei sozinha nessa longa jornada da vida.

Agradeço a Thamyres Sant'Ana pela amizade e companheirismo, por estar presente nos momentos bons e maus, dentro e fora do laboratório ao longo desse período, pelas risadas e parceria que tornaram o ambiente laboratorial muito mais leve e feliz para mim. Agradeço por todo apoio na condução dos experimentos, você foi parte essencial nesse processo, sou imensamente grata a você.

Aos colegas da turma PPGDTS 2021, em especial a Lígia Camargo e Maura Lins, mesmo à distância em tempos de pandemia COVID-19 ou presentes na volta aulas, pela parceria ao longo do mestrado, no comprimento dos créditos, nas produções e parcerias nos trabalhos, deixo aqui meu muito obrigado.

Agradeço ao meu Orientador, Luiz Everson que desde início acreditou e depositou sua confiança em mim. Agradeço a orientação e paciência, pelas insistências, e contínuo interesse nessa pesquisa, pela amizade e apoio em todos os momentos e principalmente por ter me incentivado a chegar até aqui.

Agradeço ao meu Coorientador, Luciano Huergo, pelo apoio, confiança, e paciência ao passar seus ensinamentos, pelas suas correções e incentivos, e por todo tempo dedicado a mim ao longo deste trabalho.

Agradeço em especial ao Felipe Forini que esteve envolvido desde o início das coletas das amostras de bioaerossóis no sítio ATTO. Agradeço por confiar a mim

a continuidade dessa pesquisa e pelos dados cedidos e ajudas no decorrer dessa pesquisa.

Agradeço a todos os pesquisadores que ao longo dos anos estiveram diretamente envolvidos no desenvolvimento dessa pesquisa e contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço também aos colegas de laboratório que auxiliaram inúmeras vezes no decorrer dessa pesquisa, cuja ajuda tornou possível a concretização desse trabalho.

“O essencial é invisível aos olhos”.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Caracterizada como parte essencial do suporte à vida na Terra, a biodiversidade resulta de um longo processo de evolução, especiação e imigração de novas espécies, contemplando desde a diversidade de genes até organismos mais complexos. O Brasil, de uma forma geral, é reconhecido como um dos países que possuem os maiores índices de biodiversidade do mundo. O Bioma Amazônico, por exemplo, abriga um grande número de aves, peixes de água doce, borboletas e primatas, trata-se de um domínio único no planeta. Entretanto, os dados sobre a diversidade microbiana brasileira são escassos e o mesmo vale para o conhecimento sobre a diversidade de bioaerossóis cultiváveis. O *Amazon Tall Tower Observatory* (ATTO) desempenha um papel fundamental, pois colabora para a obtenção de dados de base e documentar as atuais condições atmosféricas e ecológicas, antes das próximas mudanças que poderão mudar para sempre a face da Amazônia. Deste modo, se torna um local propício para estudos e investigações sobre os bioaerossóis cultiváveis presentes nesse ambiente. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar os isolados de bioaerossóis pertencentes a coleção microbiológica do Laboratório de Microbiologia Molecular do Setor Litoral – UFPR, coletados no ATTO em estações distintas, no período chuvoso em 2018 e no período de estiagem em 2019. Por meio da realização de um inventário dos isolados coletados nos dois períodos e identificação ao nível de gênero os isolados presentes no dendrograma, obtido por espectrometria de massas por MALDI-TOF, para então analisar a presença de potenciais atividades antimicrobianas nos extratos secundários de fungos e bactérias. Os isolados foram identificados a partir da conciliação entre os métodos de espectrometria de massa MALDI-TOF e sequenciamento Sanger dos genes específicos 16 rDNA para bactérias e 18S rDNA e Regiões do ITS para fungos. A verificação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio da técnica de difusão em disco dos extratos fúngicos e bacterianos sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As coletas de bioaerossóis cultiváveis, que ocorreram entre 2018 e 2019, resultaram no cultivo e isolamento de 200 culturas entre fungos e bactérias, sendo 77 coletados na estação seca e 123 coletados na estação chuvosa, desses foram identificados até o momento 32. Entre os isolados identificados foi possível observar a predominância dos filos *Ascomycota* (Reino fungi) e *Firmicutes* (Reino bacteria). Entre a diversidade de gêneros houve a predominância de *Bacillus* e *Penicillium*, seguidos dos gêneros *Streptomyces*, *Purpureocillium*, *Aneurinibacillus*, *Aspergillus*, *Staphylococcus*, *Gordonia* e *Paenibacillus*. Estes isolados foram cultivados e seus extratos foram avaliados quanto a capacidade de inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Dos 38 extratos produzidos pelo metabolismo secundário dos isolados avaliados, 55% foram capazes de produzir halos de inibição de crescimento bacteriano, demonstrando potencial de ação antibacteriana.

Palavras-chave: Aerossóis Biogênicos; Sazonalidade; Bactéria; Fungos; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Characterized as an essential part of life support on Earth, biodiversity is the result of a long process of evolution, speciation, and immigration of new species, ranging from gene diversity to more complex organisms. Brazil, in general, is recognized as one of the countries with the highest levels of biodiversity in the world. The Amazon Biome, for example, is home to a large number of birds, freshwater fish, butterflies, and primates; it is a unique domain on the planet. However, data on Brazilian microbial diversity is scarce, and the same is true for knowledge about the diversity of cultivable bioaerosols. The *Amazon Tall Tower Observatory* (ATTO) plays a key role, since it collaborates to obtain baseline data to document the current atmospheric and ecological conditions, before the coming changes that may change forever the face of the Amazon. Thus, it becomes an ideal place for studies on the cultivable bioaerosols present in this environment. Thus, the aim of this study was to investigate the bioaerosols isolates belonging to the microbiological collection of the Molecular Microbiology Laboratory of the Litoral Sector - UFPR, collected in the ATTO in different seasons, in the rainy period in 2018 and in the dry period in 2019. An inventory of the isolates collected in both periods was made and the isolates present in the dendrogram, obtained by MALDI-TOF mass spectrometry, were identified at the genus level. Then the antimicrobial activity of the secondary extracts of fungi and bacteria was evaluated. The isolates were identified by reconciling the MALDI-TOF mass spectrometry and Sanger sequencing methods of the specific 16 rDNA genes for bacteria and 18S rDNA and ITS regions for fungi. The verification of antimicrobial activity was performed using the disc diffusion technique of the fungal and bacterial extracts against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The collections of cultivable bioaerosols occurred between 2018 and 2019, resulting in the cultivation and isolation of 200 cultures among fungi and bacteria, being 77 collected in the dry season and 123 collected in the rainy season, of these were identified so far 32. Among the identified isolates it was possible to observe the predominance of the phyla Ascomycota (fungi kingdom) and Firmicutes (bacteria kingdom). Among the diversity of genera, *Bacilli* and *Penicillium* predominated, followed by *Streptomyces*, *Purpureocillium*, *Aneurinibacillus*, *Aspergillus*, *Staphylococcus*, *Gordonia* and *Paenibacillus*. From the 38 extracts produced by the secondary metabolism of the isolates evaluated, 55% of the extracts showed inhibition halos, demonstrating potential antibacterial action.

Key words: Bioaerosols; Amazon; Bacteria; Fungus.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MASTRO TRIANGULAR - <i>TRIANGULAR MAST</i>	26
FIGURA 2 – TORRE <i>INSTANT</i> - <i>WALK-UP TOWER</i>	27
FIGURA 3 – TORRE ALTA DA AMAZÔNIA - <i>ATTO TALL TOWER</i>	28
FIGURA 4 - PRINCIPAIS COMPONENTES DO BIOAEROSSOL PRESENTES NA ATMOSFERA.....	29
FIGURA 5 – ESQUEMA DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS A PARTIR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR MALDI-TOF E BIOTYPER.....	32
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO RIBOSSOMAL 70S E 80S.....	35
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA BACTERIANO E GENE 16S rRNA	36
FIGURA 8 – REGIÕES DO ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO (ITS).....	37
FIGURA 9 – A DESCOBERTA DA PENICILINA.....	42
FIGURA 10 – SÍTIO ATTO – ÁREA DE ESTUDO	57
FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA.....	59
FIGURA 12 – ESQUEMA DO PREPARO E CULTIVO DA AMOSTRA.....	60
FIGURA 13 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .	69
FIGURA 14 – METODOLOGIA DE DIFUSÃO EM DISCO.....	70
FIGURA 15 – MSP DENDROGRAMA DAS CULTURAS COLETADAS EM 2018 E 2019	78
FIGURA 16 – TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS CANAMICINA E TETRACICLINA	91
FIGURA 17 – EXTRATOS BACTERIANOS.....	94
FIGURA 18 – EXTRATOS FÚNGICOS.....	95

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – TOTAL DE ISOLADOS OBTIDOS POR ESTAÇÃO NO ATTO.....	71
GRÁFICO 2 – NÚMERO DE CULTURAS OBTIDAS POR MEIO DE CULTURA NA COLETA DA ESTAÇÃO CHUVOSA EM 2019	72
GRÁFICO 3 – NÚMERO DE CULTURAS OBTIDAS POR MEIO DE CULTURA SEMELHANTES NOS PERÍODOS DE COLETA 2018 E 2019.....	73
GRÁFICO 4 – NÚMERO DE CULTURAS OBTIDAS POR ALTURA NAS COLETAS DA ESTAÇÃO SECA E CHUVOSA	75
GRÁFICO 5 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA PELA FERRAMENTA <i>CLASSIFIER DO RIBOSOMAL DATABASE PROJECT</i> (RDP).....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LURIA-BERTANI BROTH ...	61
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO M9	61
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-LACTATO	62
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-MALATO	62
TABELA 5 – NÚMERO TOTAL DE SEQUÊNCIAS OBTIDAS DE ISOLADOS COLETADOS EM 2018 E 2019 NO SÍTIO ATTO, VERIFICADAS NA FERRAMENTA BLAST (NCBI).....	82
TABELA 6 – SIMILARIDADE GENOTÍPICA DAS SEQUÊNCIAS DOS ISOLADOS COM SEQUÊNCIAS DO BANCOS DE DADOS GENBANK PELA FERRAMENTA BLAST DO NCBI	83
TABELA 7 – DESCRIÇÃO DOS ISOLADOS SELECIONADOS PARA EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FÚNGICOS E BACTERIANOS	92
TABELA 8 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO EXPRESSO EM MILÍMETROS DOS EXTRATOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS ISOLADOS BACTERIANOS E FÚNGICOS.	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	JUSTIFICATIVA.....	17
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo Geral.....	18
1.2.2	Objetivos Específicos	19
2	CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	A BIODIVERSIDADE E O BIOMA AMAZÔNICO	20
2.1.1	Perda da biodiversidade.....	23
2.2	OBSERVATÓRIO TORRE ALTA DA AMAZÔNIA	25
2.3	BIOAEROSSÓIS	29
2.4	ANÁLISE DE PERFIS PROTEICOS NA ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR MALDI-TOF	31
2.5	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE FUNGOS E BACTÉRIAS	33
2.6	POTENCIALIDADES PARA O USO SUSTENTÁVEL: UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	37
2.6.1	Atividade antimicrobiana.....	41
	REFERÊNCIAS	46
3	CAPÍTULO II	55
3.1	INTRODUÇÃO.....	55
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.2.1	Área de Estudo	57
3.2.2	Preparo da Amostra.....	59
3.2.3	Meios de Cultivo	60
3.2.3.1	Meio Luria-Bertani (LB).....	60
3.2.3.5	Meio NFB-Lactato.....	62
3.2.5.6	Meio NFB-Malato.....	62
3.2.4	Espectrometria de Massas MALDI-TOF	63
3.2.5	Amplificação de DNA por PCR	64
3.2.6	Eletroforese de DNA.....	65
3.2.7	Reação de Sequenciamento de DNA	65
3.2.8	Análise das sequências	66
3.2.9	Teste suscetibilidade antimicrobiana	66
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71

3.3.1	Cultivo dos isolados.....	71
3.3.2	Análise em MALDI-TOF e <i>BIOTYPER</i>	77
3.3.3	Taxonomia Molecular de Fungos e Bactérias.....	80
3.3.4	Teste de suscetibilidade aos antibióticos.....	90
3.3.5	Extração dos metabólitos secundários fúngicos e bacterianos	91
3.3.6	Teste de suscetibilidade antimicrobiana dos metabólitos secundários fúngicos e bacterianos	95
4	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

Caracterizada como parte essencial do suporte à vida na Terra, a biodiversidade resulta de um longo processo de evolução, especiação e imigração de novas espécies, contemplando desde a diversidade de genes à organismos complexos e as relações entre eles e deles com o meio. A ciência da biodiversidade também inclui o descobrimento ou a descrição de novas espécies, suas interações bem como estudos sobre o processo evolutivo e ecológico, juntamente com estudos que abrangem os serviços ambientais, o valor socioeconômico e cultural da biodiversidade, como também a definição de mecanismos e estratégias para sua conservação e uso sustentável (JOLY, et al., 2011).

No entanto, no último século, em virtude das atividades humanas como as emissões de CO₂ liberadas na atmosfera, e em decorrência, principalmente da utilização de combustíveis fósseis, desmatamentos e queimadas, muitas espécies entraram em processo de extinção. Tais ações têm contribuído para a redução da biodiversidade, colocando em risco a própria existência humana (ARTAXO et al., 2009; ZALASIEWICZ et al., 2010).

Ao que tudo indica estamos vivenciando um novo período de extinção em massa, dessa vez influenciada pelas alterações ambientais em escala global causadas pelos humanos (NETO, 2018). Estando entre as principais causas dessa catástrofe: a superexploração da natureza, a redução e a perda de habitat, alterações climáticas, poluição e a introdução de espécies exóticas, podendo estes variar entre regiões geográficas e ao longo do tempo (NETO, 2018; OLIVER, 2018).

De uma forma geral, apesar de o bioma amazônico ser constituído por uma floresta mega diversa, a biodiversidade da Amazônia ainda é pouco conhecida pelo homem, em razão da sua magnitude. Com toda sua extensão e diversidade de ambientes, ainda pode ser descrita como fronteira de conhecimento, uma vez que ano após ano novas espécies vêm sendo descritas (SANTOS et al., 2017; JOLY et al., 2022).

Deste modo, de acordo com Santos (2017), estudar e proteger esse patrimônio natural extremamente ameaçado, pode revelar inúmeros benefícios para a sociedade de uma forma geral, se tornando uma missão fundamental, que vai além da esfera ambiental, abrangendo aspectos sociais e econômicos.

Por outro lado, o bioma amazônico enfrenta as consequências dos impactos causados pelo desmatamento e queimadas de origem antrópica, afetando diretamente os serviços ecossistêmicos por ela desempenhados, como o clima e a formação de nuvens no decorrer da estação seca (FEARNSIDE, 2005; SILVA et al., 2006; ARTAXO et al., 2009; SANTOS et al., 2017). A ciclagem hidrológica também é afetada e suas grandes trocas de energia e vapor de água em áreas de florestas tropicais, contribuem para o equilíbrio do sistema climático da Terra.

Assim, uma parceria entre o Brasil e Alemanha fundou, em 2010, o Observatório Torre Alta da Amazônia – *Amazon Tall Tower Observatory* (ATTO), com o objetivo de analisar a dinâmica da atmosfera e medir os impactos das mudanças climáticas globais na floresta Amazônica a longo prazo. Este centro, tem servido de apoio ao longo dos anos para o desenvolvimento de diversas pesquisas que contribuem diretamente para o entendimento dos papéis desempenhados pela floresta Amazônica na manutenção dos serviços ecossistêmicos, nos processos de formação e desenvolvimento de nuvens, bem como na emissão de gases do efeito estufa (COSTA, 2021).

Neste contexto, tem-se desenvolvido rapidamente a aeromicrobiologia, ramo da microbiologia ambiental que estuda a vida no ar, ou seja, o lançamento de bioaerossóis no ar, transmissão aérea e deposição de materiais biológicos (PEPPER; GERBAR, 2015). Embora seja considerada uma área em constante evolução, está se destacando e chamando cada vez mais atenção de diversos campos, incluindo saúde pública, ciências ambientais, engenharia industrial e agrícola (PEPPER; GERBAR, 2015).

Entre os principais interesses em aeromicrobiologia estão atualmente a detecção de microrganismos potencialmente nocivos à saúde humana em ambientes fechados (GANDOLFI, 2013). No entanto, poucos estudos relataram a diversidade de bactérias e fungos de bioaerossóis cultiváveis em ambientes de floresta (GANDOLFI, 2013; SOUZA, 2019; SOUZA et al., 2021). Sendo assim, estudos que possam revelar o potencial microbiológico do ar se constituem em um campo de investigação promissor e importante do ponto de vista social, econômico e ambiental.

Conceitualmente, aerossóis biológicos ou bioaerossóis, são conhecidos como um subgrupo de partículas atmosféricas dispensados diretamente da biosfera para a atmosfera, podendo conter organismos vivos e mortos como bactérias, archaea, algas, fungos, líquens e briófitas, com uma variedade de tipos (DESPRÉS et al., 2012;

FRÖHLICH-NOWOISKY et al, 2016; ŠANTL-TEMKIV, 2019). Podem variar em tamanho entre 0,02 e 100 μm de diâmetro, sendo a composição dependente de diferentes fatores ambientais, como temperatura, radiação solar, teor de oxigênio e poluentes em suspensão no ar, além do tipo de partículas aos quais estão associados, como névoa ou poeira, e os gases nos quais o bioaerossol está suspenso (PEPPER; GERBAR, 2015).

Cabe aqui ainda mencionar que os microrganismos aéreos ou bioaerossóis, são um conteúdo promissor para pesquisa científica e são eficazes em fornecer informações sobre características ecossistêmicas (DESPRÉS et al., 2012). Sendo originados do solo, vegetação e superfícies aquáticas, têm na atmosfera seu habitat (ŠANTL-TEMKIV, 2019; SOUZA et al., 2021).

Portanto, os bioaerossóis ganham relevância, pois colaboram na disseminação de organismos, tornando possível a troca genética entre *habitats* e mudanças geográficas nos biomas, sendo ainda considerados elementos centrais no desenvolvimento, evolução e dinâmica dos ecossistemas (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016).

Por possuírem em sua composição fungos e bactérias, esses microrganismos aéreos, podem apresentar um conteúdo promissor para investigação de atividade biológica de metabólitos secundários. Uma vertente interessante é a avaliação do seu potencial frente às cepas resistentes aos antibióticos convencionais. Pode-se inferir que o conhecimento do potencial da biodiversidade brasileira na produção de compostos bioativos é fundamental para o sucesso na sua conservação e uso sustentável.

Assim, considerando que a ciência tem um conhecimento limitado sobre o papel dos bioaerossóis na atmosfera e sabe pouco sobre os bioaerossóis presentes em ambientes de florestas, juntamente com a falta de informações sobre como a sazonalidade afeta a composição dos bioaerossóis cultiváveis, e considerando também que esse local está dentro de uma unidade de conservação, este estudo pode contribuir para aumentar nosso conhecimento sobre a diversidade aeromicrobiológica. Além disso, pode representar uma importante fonte de recursos biotecnológicos para futuras investigações. Diante dos fatos acima mencionados, esta pesquisa dá sequência ao estudo iniciado por Souza (2019), que coletou amostras de ar entre os anos 2018 e 2019 em estações distintas (período de seca e chuvoso) na estação

científica *Amazon Tall Tower Observatory* - ATTO localizada na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã, no estado do Amazonas.

Ressalta-se que diferentes pesquisadores estiveram envolvidos no processo de coleta e análises dos dados aqui relatados.

Assim, a presente pesquisa busca realizar um inventário dos isolados de bioaerossóis cultiváveis coletados na floresta amazônica nas estações seca e chuvosa, pertencentes a coleção microbiológica do Laboratório de Microbiologia Molecular do Setor Litoral – UFPR, dando continuidade ao processo de sequenciamento e identificação, a fim de analisar o potencial de isolados na produção de atividade antimicrobiana.

1.1 JUSTIFICATIVA

A biodiversidade brasileira é reconhecida mundialmente por seu grande potencial para a conservação, uso sustentável e bioprospecção (PEIXOTO, 2016). Tamanha diversidade biológica, constitui uma biblioteca de dados moleculares inigualável (JOLY et al., 2022). No Brasil, a ciência da biodiversidade é reconhecida como área prioritária de investigação científica (JOLY et al., 2011).

Segundo Joly et al. (2011) a pesquisa em biodiversidade pode ser dividida em três grupos: a descoberta e caracterização da biodiversidade, inclusive marinha e em paisagens alteradas – sistemática e taxonomia; a compreensão do funcionamento de ecossistemas e serviços ambientais, inclusive marinhos, e pôr fim a bioprospecção da quimiodiversidade da biota brasileira.

Desse modo, a produção de conhecimento a partir da investigação da biodiversidade permite a diminuição das lacunas sobre o conhecimento do patrimônio biológico brasileiro, tornando esse conhecimento útil para diversos segmentos da sociedade (PEIXOTO, 2016). Sabe-se que um dos compromissos assumidos pelos países signatários da Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) é o conhecimento da biodiversidade como um precursor para a sua conservação e uso sustentável (BRASIL, 1992).

No entanto, o bioma amazônico, que é megabiodiverso, enfrenta as consequências dos impactos causados pelo desmatamento e queimadas de origem antrópica. Estas afetam diretamente o clima no processo de formação de nuvens, bem

como nos demais serviços ecossistêmicos desempenhados pela floresta Amazônica (FEARNSIDE, 2005; SILVA et al., 2006; ARTAXO et al., 2009; SANTOS et al., 2017).

Embora se reconheça que a ciclagem hidrológica e suas grandes trocas de energia e vapor de água em áreas de florestas tropicais possuem grande importância para o sistema climático da Terra, a função exercida por meio das interações bioaerossóis-nuvens ainda é pouco conhecida (PÖSCHL et al., 2010; ŠANTL-TEMKIV et al., 2019).

Um outro fato importante é a dimensão. Apesar da grande extensão, da diversidade de ambientes e abundância de espécies, a floresta Amazônica ainda é considerada uma fronteira do conhecimento científico, embora ano após ano, sofra com um processo de perda de biodiversidade em virtude das atividades humanas (JOLY et al., 2022).

Grande parte da microbiota presente na atmosfera também é pouco conhecida pela ciência e há poucos estudos sobre a dinâmica de bioaerossóis cultiváveis coletados em estações distintas na atmosfera da floresta amazônica. Estudos mais detalhados podem contribuir para melhorar a compreensão sobre a funcionalidade da microbiota presente neste local, para o conhecimento das potencialidades biogênicas e para o entendimento das interações microbiológicas neste ecossistema complexo, além de contribuir para entendimento das interações entre a biosfera e a atmosfera nessa importante região (SOUZA, 2019).

Portanto, diante dos inúmeros desafios que envolvem a conservação e o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, pesquisas com a utilização de recursos naturais, entrelaçadas nos princípios sustentáveis, possuem importância significativa no conhecimento de espécies nativas com potenciais de usos e de propagação, além de contribuir no equilíbrio do ecossistema (CONFORTIN, 2019).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar os isolados de bioaerossóis cultiváveis, coletados no interior da floresta amazônica em estações distintas, pertencentes a coleção microbiológica do Laboratório de Microbiologia Molecular do Setor Litoral – UFPR.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar um inventário dos isolados de bioaerossóis cultiváveis coletadas da floresta amazônica na ATTO nas estações seca e chuvosa.
- Identificar, em nível de gênero, os isolados de bioaerossóis cultiváveis de estações seca e chuvosa da Estação ATTO.
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos secundários de fungos e bactérias.

2 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A BIODIVERSIDADE E O BIOMA AMAZÔNICO

A Biodiversidade é um termo que resulta da forma contraída das palavras “diversidade biológica”. Foi idealizado por Walter G. Rosen, do *National Research Council / National Academy of Sciences* (NRC/NAS) em 1985, quando planejava a realização de um fórum sobre diversidade biológica (*National Forum on BioDiversity*), quando as preocupações com a conservação da natureza tomavam impulso (FRANCO, 2013). No entanto, só apareceu pela primeira vez em uma publicação em 1988 no livro cujo título foi justamente “*Biodiversity*”. O livro foi organizado por Edward O. Wilson que trazia os resultados do *National Forum on BioDiversity* (FRANCO, 2013).

O conceito de diversidade biológica, mais amplamente conhecido, deriva de um dos eventos mais importantes relacionados com a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (ECO-92) no Rio de Janeiro em 1992. A Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD) é um dos documentos mais importantes resultantes da ECO-92, o qual tornou-se referência sobre o tema. A CBD definiu a Diversidade biológica 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 (BRASIL, 1992, Art. 2).

Sendo caracterizada como parte essencial do suporte à vida na Terra, a biodiversidade resulta de um longo processo de evolução, especiação e imigração de novas espécies, contemplando desde a diversidade de genes a organismos complexos (JOLY et al., 2011; OLIVER, 2018).

Para além do valor individual de cada espécie, seu conjunto, assim como as interações bióticas e abióticas, contribui para manutenção de serviços ecossistêmicos essenciais para a vida no planeta (JOLY et al., 2011).

Segundo Joly et al. (2011), a ciência da biodiversidade também inclui o descobrimento ou a descrição de novas espécies e suas interações, bem como estudos sobre o processo evolutivo e ecológico. Destacam-se os estudos que

abrangem os serviços ecossistêmicos, o valor socioeconômico e cultural da biodiversidade, como também a definição de mecanismos e estratégias para sua conservação e uso sustentável.

Ao falar sobre biodiversidade, a floresta amazônica se destaca entre as demais. Constituída principalmente por uma floresta tropical, abriga cerca de 50% da biodiversidade mundial. Caracterizada como a floresta mais extensa do planeta, se encontra distribuída em uma área de aproximadamente 6,3 milhões de Km², abrangendo países como Brasil, Peru, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia e Guianas. Correspondendo a mais de 50% do território nacional, a Amazônia legal ocupa cerca de 5 milhões de Km², aproximadamente 5.033.072 Km², entre os estados Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins além de partes dos estados do Mato Grosso e Maranhão (ARANA, 2009; SANTOS et al., 2017).

Por sua grande dimensão, a floresta amazônica apresenta uma alta diversidade de espécies em comparação com outros tipos de floresta. Em termos de biodiversidade a riqueza biológica da Amazônia é tão grande que engloba, total ou parcialmente, elementos de 49 das 200 ecorregiões mundiais, sendo mais de 600 diferentes tipos de habitats terrestres e de água doce (SANTOS et al., 2017).

Em termos de espécies, nenhum outro domínio no mundo apresenta tantas espécies de aves, peixes de água doce, borboletas e primatas como na Amazônia. Destaca-se ainda aproximadamente 16.000 espécies arbóreas por toda sua extensão. No entanto, é preciso mencionar que ainda pouco se sabe sobre esse território mega diverso. Contudo, anualmente muitas espécies são descobertas e catalogadas. Em dez anos, entre 1999 e 2009, mais de 1.200 espécies foram descobertas por cientistas na região (CORREIA et al., 2006; WFF, 2010; BRASIL, 2012; STEEGE et al., 2013; SANTOS et al., 2017; PRADO, 2021). Devido a sua magnitude, a floresta amazônica desempenha funções imprescindíveis na manutenção de serviços ecossistêmicos. Pode-se conceituar como serviços ecossistêmicos:

Benefícios oferecidos pelo ecossistema e pela diversidade biológica aos seres humanos, servindo de base para ou melhorando sua condição de vida. Eles resultam dos processos ecológicos oriundos da interação entre espécies ou de espécies com seu ambiente podem ser divididos em três categorias principais: de provisão (comida, água potável e combustível), de regulação (regulação de clima, água e doenças), de suporte (produção primária e formação do solo) (PEIXOTO, 2016, p. 144).

Segundo Fearnside (2008), entre os principais serviços ecossistêmicos da Amazônia estão: a manutenção da biodiversidade, do estoque de carbono, a mitigação do aquecimento global e a ciclagem da água. Deste modo, a floresta Amazônica desempenha um papel fundamental na manutenção dos ciclos biogeoquímicos, garantindo a qualidade do solo, bem como dos maiores estoques de água doce do mundo, além de contribuir nos processos de evaporação e transpiração, ajudando na manutenção do equilíbrio climático (ANDREAE et al., 2015; CORREIA et al., 2006; COSTA, 2009).

Do ponto de vista climático, a Amazônia também exerce funções de grande importância em escala global, podendo agir como fonte de calor e vapor, fazendo evapotranspiração da água para atmosfera global. Seu valor está em se encontrar na região dos trópicos, o que torna possível trocas de energia entre a superfície continental e a atmosfera global durante o ano (CORREIA et al., 2006; COSTA, 2009, SANTOS et al., 2017). De acordo com Souza (2019), sua atmosfera é composta principalmente por uma variedade de gases, aerossóis de origem biogênica e antropogênica, com dinâmicas e processos ainda pouco compreendidos.

De maneira geral, a atmosfera da Amazônia central apresenta características distintas em relação a sazonalidade entre uma estação chuvosa (entre fevereiro e maio com precipitações com um máximo de 335 mm por mês) e uma estação seca (entre agosto e novembro com um mínimo de cerca de 47 mm por mês) influenciada pelas queimadas, podendo apresentar períodos de transição correspondentes entre as duas estações (ANDREAE et al., 2015; PÖHLKER et al., 2019; SOUZA, 2019).

As florestas úmidas, em geral, desempenham um papel crucial na emissão de pequenas partículas conhecidas como bioaerossóis, que consistem em organismos vivos ou mortos liberados na atmosfera. Essas partículas têm a capacidade de atuar como Núcleos de Condensação de Nuvens (NCN), influenciando os processos de formação de nuvens e chuvas. Além disso, as florestas úmidas apresentam uma grande diversidade de espécies, o que resulta em uma alta rotatividade de biomassa. Especificamente na região amazônica, o transporte dessas partículas da biosfera para a atmosfera é significativo, conforme destacado por Santos et al. (2017) e Artaxo et al. (2013). No decorrer da estação chuvosa, ocorrem emissões do tipo natural, sem grandes interferências de origens antropogênicas, como a poluição da atmosfera. Tal fato contribui para formação de nuvens e precipitações na região (SANTOS et al., 2017). No entanto, no decorrer da estação seca, emissões de origem antropogênica,

através da poluição e fumaça das queimadas, se tornam predominantes, desencadeando um processo de altas concentrações de partículas de aerossóis na atmosfera. Esse fenômeno contribui para a supressão de precipitação, além de favorecer mudanças na microfísica das nuvens afetando diretamente o balanço de radiação na superfície (ANDREAE et al., 2004; ARTAXO et al., 2005; PAULIQUEVIS et al., 2007).

Um estudo realizado por Souza et al., (2021), os autores demonstraram a diversidade de bactérias em bioaerossóis não cultiváveis na floresta amazônica durante as estações seca e chuvosa. Por meio de análises metagenômicas foi possível observar ao nível de família os táxons mais presentes nas amostras. Destacaram-se as famílias *Enterobacteriaceae* (19%), *Beijerinckiaceae* (11%), *Polyangiaceae* (10%), *Bacillaceae* (5%) e *Ktedonobacteraceae* (5%). Além disso, os dez gêneros mais representativos foram: *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pajaroellobacter*, *Ottowia*, *Acinetobacter*, *Cloacibacterium*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium* e *Sphingomonas*. Tais resultados demonstram de maneira ímpar o quão importante são os estudos sobre bioaerossóis para compreender a composição aeromicrobiológica da atmosfera.

Entre as famílias identificadas nas amostras, destacam-se as famílias *Azospirillaceae*, *Bacillus*, *Streptomyetaceae*. São famílias conhecidas na literatura por possuírem potencial biotecnológico, demonstrando que os estoques de genes e microrganismos presentes na região amazônica possibilitam novos ciclos relacionados à investigação biotecnológica. Sendo assim, catalogar e compreender a diversidade presente em bioaerossóis é o primeiro passo para entender a distribuição biogeográfica e o potencial biotecnológico desses microrganismos.

2.1.1 Perda da biodiversidade

A crise ambiental que se deflagrou entre os anos 1960 e 1980 internacionalmente, ganhou popularidade e ultrapassou os limites acadêmicos. Desse modo, diferentes segmentos da sociedade tiveram a oportunidade de perceber as diversas ameaças às diferentes formas de vida em todo o planeta (BPBES, 2019). As mudanças na distribuição de espécies, que antes ocorriam na escala de milhares de anos, agora são observadas em décadas, e há uma crescente discordância entre o

processo evolutivo e a velocidade das mudanças climáticas (ZALASIEWICZ et al., 2008, 2010; JOLY et al., 2011; ARTAXO, 2014).

No antropoceno, nova proposta de mudança da escala de tempo geológica, as mudanças globais ocasionadas pelas atividades humanas afetam diretamente a natureza, bem como os seus serviços ecossistêmicos (ZALASIEWICZ et al., 2010). No processo das mudanças climáticas, o aquecimento global, por exemplo, originado pelo aumento da temperatura nos últimos séculos, relacionado com as altas taxas de CO₂ liberado na atmosfera, em decorrência principalmente da utilização de combustíveis fósseis, desmatamentos e queimadas, está contribuindo diretamente para o processo de redução da biodiversidade, intensificando o processo de extinção de várias espécies (NETO, 2018, OLIVER, 2018).

Ao longo dos anos, diversos estudos vêm demonstrando o avanço do arco do desmatamento sobre a floresta amazônica e o quanto este contribui para o empobrecimento da biodiversidade na região. Este processo predador danifica o ciclo hidrológico, modificando drasticamente o transporte de umidade fornecido pela floresta para regiões do sul e sudeste do Brasil, causando a supressão de chuvas não apenas em território nacional, como também em partes da América do Sul (SANTOS et al., 2017; FEARNSSIDE, 2005).

Entre as principais causas de perda da biodiversidade e ameaças aos serviços ecossistêmicos prestados pela floresta amazônica estão a degradação das terras e da água como consequência de diversas pressões antrópicas causadas por empreendimentos como mineradoras, hidrelétricas, atividades relacionadas a petróleo e gás, criação de gado, plantio de soja e rodovias, essas atividades são diretamente associadas ao desmatamento, o corte seletivo e incêndios (FEARNSSIDE, 2005; ISA, 2015; PRADO, 2021).

É sabido que a perda da biodiversidade em florestas tropicais empobrece a biodiversidade da terra. De acordo com um levantamento feito por Zalasiewicz et al. (2010), estimativas atuais indicam que a taxa de extinção é 100-1000 vezes maior que o nível de fundo (períodos fora dos eventos de extinção em massa), podendo ser elevada 10 vezes mais ainda neste século.

No entanto, é preciso mencionar que, de acordo com Oliver (2018), o processo de perda da biodiversidade ocorreu de forma natural anteriormente e ocorre continuamente, mesmo na ausência de intervenção humana. Todavia, geralmente esses processos foram influenciados por grandes eventos, tais como: o rápido

resfriamento da terra, mudanças no nível do mar, estagnação oceânicas, erupções vulcânicas, liberações catastróficas de metano e impactos de asteroides, ocasionando extinções em massa (ZALASIEWICZ et al., 2010; OLIVER, 2018).

No entanto, parece que a biodiversidade está passando por um novo evento de extinção em massa, evidenciado pelos impactos das atividades humanas em larga escala (ARTAXO, 2014; ZALASIEWICZ et al., 2010; DÍAZ et al., 2006; OLIVER, 2018). Conforme Oliver (2018) e Neto (2018), entre os principais mecanismos de perda de biodiversidade, causados pelas atividades humanas estão: a superexploração de recursos naturais, a fragmentação, a degradação de habitat, as alterações climáticas e a introdução de espécies exóticas. Os autores também concluem que tais mecanismos podem variar entre regiões geográficas e ao longo do tempo.

Apesar das florestas tropicais se encontrarem entre os ecossistemas mais ricos em biodiversidade do planeta, contendo cerca de 20%, 60% e 70% de todos os mamíferos, aves e anfíbios conhecidos, respectivamente (WILKIE et al., 2011), são também muito ameaçadas. O fato é que, a floresta Amazônica se encontra ameaçada por atividades humanas. Mas, por exercer um papel importante na manutenção dos serviços ecossistêmicos, não deveria manter o ritmo da destruição (FEARNSIDE, 2005).

Portanto, as atividades humanas no antropoceno e suas consequências sobre a biodiversidade, demonstram o quão importante são os estudos que busquem alternativas para conciliar o uso sustentável dos recursos naturais e as medidas necessárias para sua conservação, bem como privilegiem um melhor aproveitamento desse patrimônio natural (CONFORTIN, 2019).

2.2 OBSERVATÓRIO TORRE ALTA DA AMAZÔNIA

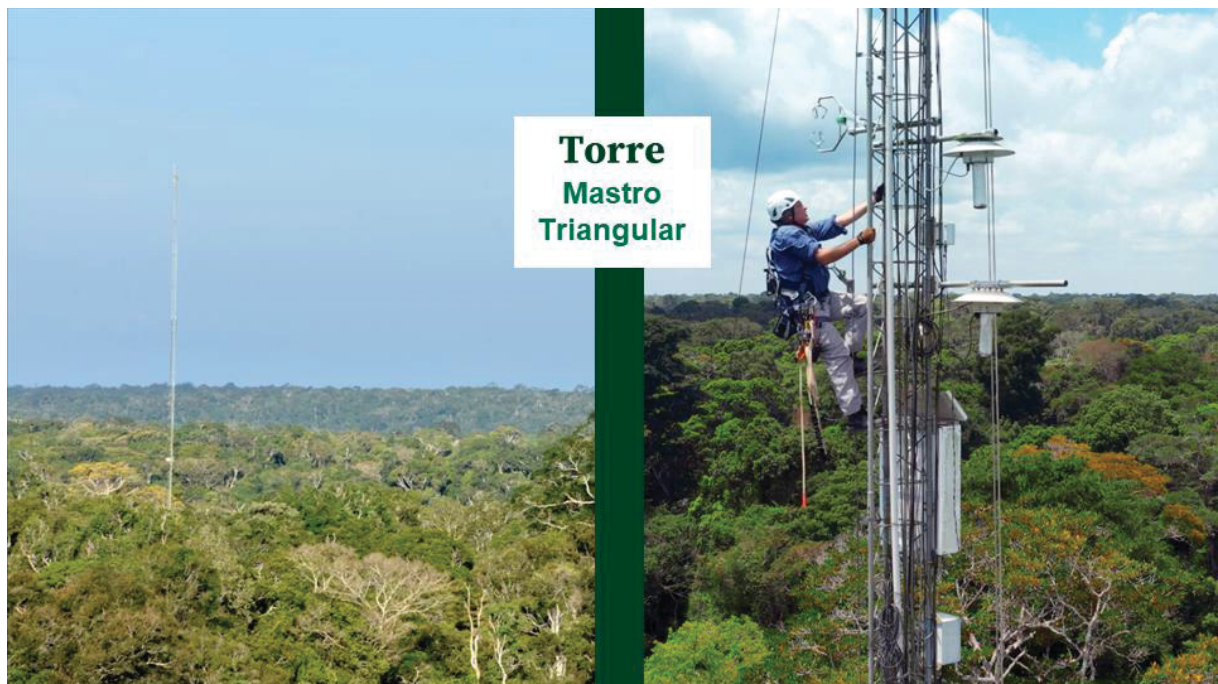
O Observatório Torre Alta da Amazônia (ATTO – sigla em inglês para *Amazon Tall Tower Observatory*) é um projeto germano-brasileiro criado em 2010, coordenado desde a sua criação pelo (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia) INPA no lado brasileiro e pelo Instituto Max Planck de Química, no lado alemão. De acordo com Andreae et al. (2015) para a escolha do local e desenvolvimento desse projeto levaram-se em conta os seguintes critérios:

(1) grande busca com o mínimo de perturbação humana atual, mas com potencial mudança futura do uso da terra em grande escala, (2) topografia relativamente plana sem grandes áreas úmidas na região de busca, (3) estável e propriedade da terra protegida e acesso controlado, e (4) a possibilidade de chegar ao local em tempo razoável para facilitar a pesquisa e as atividades educacionais (ANDREAE et al., 2015, p. 10728).

O sítio ATTO é composto por três torres utilizadas para monitoramento contínuo de gases importantes como CO₂, CH₄, CO e N₂O. Encontra-se situado entre os municípios de Itapiranga e São Sebastião do Uatumã, a 150 km da cidade de Manaus. Está localizado em uma região central do estado Amazônia, inserido no interior da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã, em um local de floresta intocada (2.14395°S, 58.99987°W) (ANDREAE et al., 2015).

Tendo início em 2010 com a implementação de um mastro triangular de 81 m para medições piloto, é utilizado para um amplo conjunto de medições de aerossóis. Sendo acessível apenas com equipamentos de escalada, conforme FIGURA 1 (ANDREAE et al., 2015).

FIGURA 1 – MASTRO TRIANGULAR - TRIANGULAR MAST



FONTE: Adaptado de ATTO *project* (2022).

Em 2011 foi construída a torre Instant de 80 m, e entrou em operação em 2012. Esta é usada para análises meteorológicas e medições gasosas (FIGURA 2). Por último tem-se a torre ATTO de 325 m de altura concluída em 2017 (FIGURA 3). A

sua altura é superior em 25 metros, quando comparada, por exemplo, com a Torre Eiffel francesa. A torre ATTO, como as demais, é utilizada para melhorar a nossa compreensão da dinâmica de carbono da floresta amazônica sob mudanças climáticas, uso da terra e outras influências antrópicas (ANDREAE et al., 2015).

FIGURA 2 – TORRE INSTANT - WALK-UP TOWER



FONTE: Adaptado De Bianca Lauter (2020); Martin Kunz – MPI/BGC (2022).

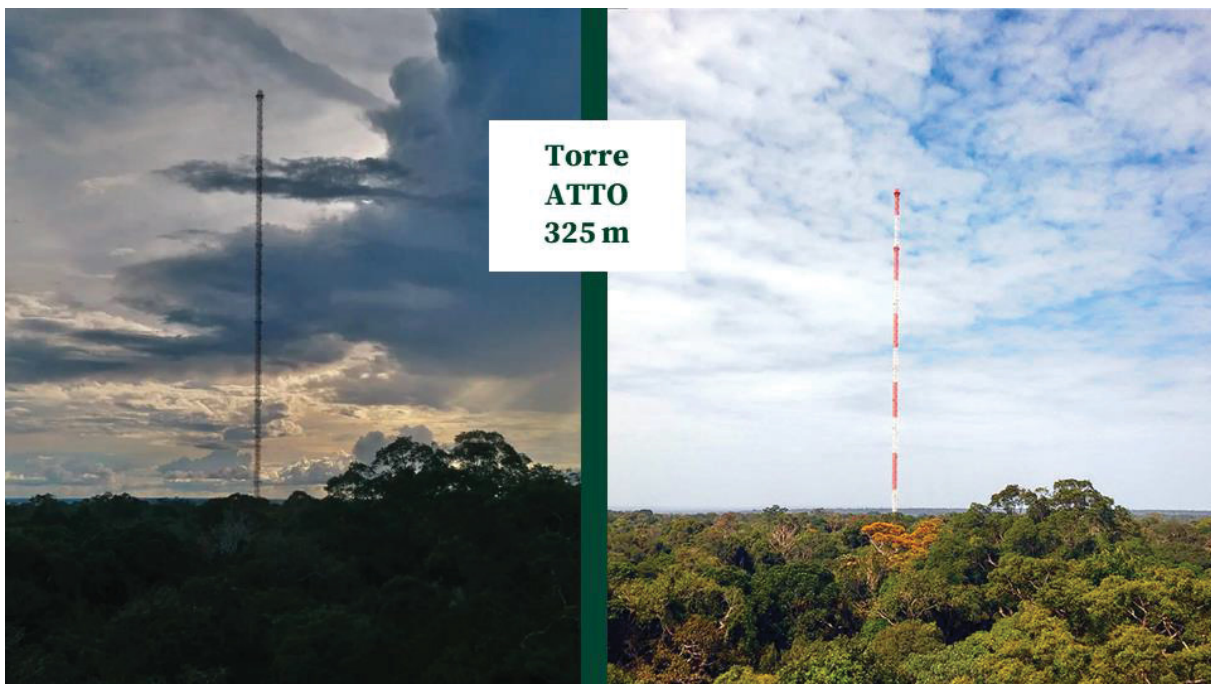
Planejado com o intuito de medir os impactos das mudanças climáticas globais na floresta Amazônica a longo prazo, por meio de medidas da interação entre a floresta e atmosfera, o sítio ATTO, contribui diretamente para o desenvolvimento de pesquisas inéditas sobre a química da atmosfera, permitindo medições de gases do efeito estufa, além de outros processos que ocorrem no transporte de massa e energia na camada limite atmosférica. Tem também como objetivo colaborar para o entendimento de processos de formação e desenvolvimento de nuvens (ANDREAE et al., 2015; COSTA, 2021; PÖHLKER et al., 2019;).

Por estar localizado na parte central da Amazônia é possível observar uma grande variação sazonal em relação a uma estação chuvosa limpa (fevereiro a maio), caracterizada por troca entre a biosfera e a atmosfera praticamente imperturbável, na qual os bioaerossóis são emitidos pela biota ou produzidos fotoquimicamente por meio de vapores orgânicos biogênicos e uma estação seca fortemente influenciada pela

queima de biomassa, de agosto a novembro (PÖHLKER et al., 2019; MARTIN et al., 2010; ANDREAE et al., 2015).

Desde o momento da sua criação, a estação científica não parou de desenvolver-se. Ao longo dos anos recebeu mais de 200 pesquisadores de diferentes universidades e instituições nacionais e internacionais que desenvolveram pesquisas sobre questões importantes acerca do clima amazônico. Como resultado, inúmeros artigos foram publicados com dados coletados de forma interdisciplinar por biólogos, ecologistas, meteorologistas, químicos e físicos atmosféricos, na tentativa de entender a dinâmica complexa da atmosfera da amazônica (COSTA, 2021).

FIGURA 3 – TORRE ALTA DA AMAZÔNIA - ATTO TALL TOWER



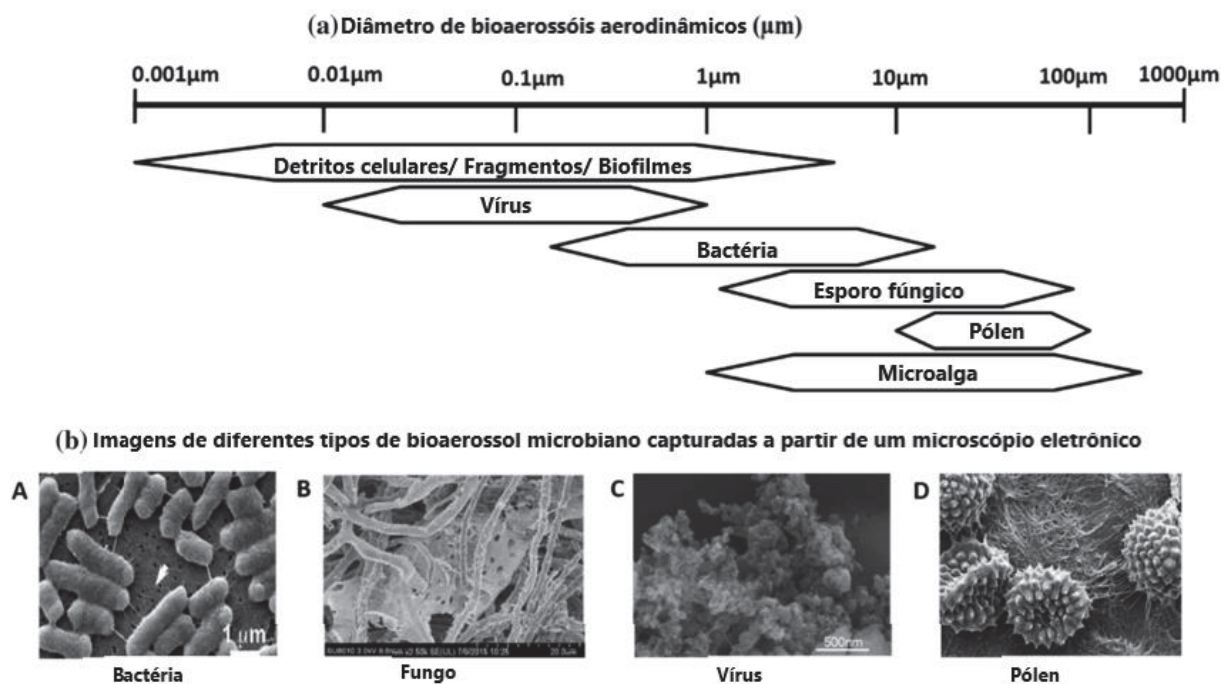
FONTE: Adaptado De Jorge Saturno – ATTO Project (2022).

É evidente que o cenário dos impactos causados pelo desmatamento e queimadas na região amazônica tem aumentado gradualmente, o que coloca em risco não somente a biodiversidade, mas também todos os serviços ecossistêmicos por ela prestados (SANTOS et al., 2017). Desta forma, é urgente obter dados de base para documentar as atuais condições atmosféricas e ecológicas, antes das próximas mudanças que poderão alterar para sempre a face da Amazônia (ANDREAE et al., 2015).

2.3 BIOAEROSSÓIS

Aerossóis biológicos ou bioaerossóis são conhecidos como um subgrupo de partículas atmosféricas dispensados diretamente da biosfera para a atmosfera, podendo conter organismos de várias afiliações taxonômicas como bactérias, archaeas, algas, fungos, líquens e briófitas, com uma variedade de tipos (FIGURA 4), composições, tamanhos e proporções diferentes, até mesmo células mortas, dormentes ou metabolicamente ativas e de potencial genético (DESPRÉS et al., 2012; FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016; ŠANTL-TEMKIV et al., 2019).

FIGURA 4 - PRINCIPAIS COMPONENTES DO BIOAEROSSOL PRESENTES NA ATMOSFERA.



FONTE: Traduzido de SHARMA et al., 2019.

No geral, sabe-se que os bioaerossóis possuem alta relevância na disseminação de organismos, tornando possível a troca genética entre habitats e mudanças geográficas nos biomas, sendo ainda considerados elementos centrais no desenvolvimento, evolução e dinâmica dos ecossistemas (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016).

A função exercida pelo bioaerossóis na atmosfera ainda não está totalmente compreendida, no entanto, diversos estudos têm avançado na busca para compreender o papel dos bioaerossóis na formação de nuvens. Sabe-se que os

bioaerossóis podem exercer efeitos diretos e indiretos sobre o clima, principalmente na capacidade de absorver e dispersar a luz (ŠANTL-TEMKIV et al., 2019). Os bioaerossóis também vem sendo descritos como importantes agentes na transformação de nuvens, precipitação e clima, agindo como núcleos de condensação de nuvens (CCN), que nucleiam gotículas de nuvens líquidas, ou partículas de nucleação de gelo (INPs), promovendo o congelamento de gotículas de nuvens (MÖHLER et al., 2007; PÖSCHL et al., 2010).

A partir levantamento bibliográfico realizado por Šantl-temkiv et al. (2019), os autores descrevem que a formação de gotículas de nuvens nos núcleos de condensação de nuvens biogênicos, pode ser beneficiada pela presença de biossurfactantes, que são moléculas anfifílicas responsáveis pela diminuição da tensão superficial da água. Além disso, os autores relatam que os efeitos da chuva, desencadeados por nucleadores de gelo biológicos, podem envolver a multiplicação através da formação secundária de gelo e *feedbacks* positivos em larga escala. No entanto, por possuir uma composição e fisiologia complexas, as propriedades químicas e físicas dos bioaerossóis permanecem em grande parte desconhecidas e necessitam de mais estudos para melhor compreensão.

No *Amazon Tall Tower Observatory*, estudos científicos seguem na tentativa de entender a influência dos bioaerossóis na dinâmica atmosférica da floresta amazônica. Para a identificação óptica da composição dos bioaerossóis em diferentes alturas (26, 40, 60, 80 e 300 m), um estudo realizado por Barbosa et al. (2022) os autores mostraram que a composição de aerossóis biológicos primários (PBA) é constituída principalmente por pólen, esporos de fungos, conídios semelhantes a leveduras, esporos de samambaias, esporos de briófitas, detritos do dossel que incluem pequenos fragmentos de folhas, madeira, ceras vegetais, glândulas foliares, fragmentos de insetos, silicatos estruturais e outras partículas como fumaça e frações de minerais.

Outro estudo realizado por Prass et al. (2021), na estação chuvosa na torre alta, utilizou o potencial analítico da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), para obter gradientes verticais em nível de domínio, por meio da quantificação de células de Bacteria, Archaea e Eukarya sobre a floresta tropical em diferentes alturas de amostragem (5, 60 e 325 m). Os autores observaram a presença dominante do domínio Eukarya com 29%–72% e bactérias 13%–26%, enquanto o domínio Archaea apresentou 0,5%–5% um papel menor na população e a variabilidade de bioaerossóis.

Embora nos últimos anos tenha ocorrido um crescente interesse no estudo de bioaerossóis e alguns aspectos tenham sido pesquisados, como identificação, quantificação, dispersão e epidemiologia, a pesquisa sobre bioaerossóis ainda é embrionária, com várias lacunas em aberto, sendo necessário entender alguns processos como, variabilidade temporal e espacial, diversidade e interações ecológicas, os potenciais aplicações e funções da comunidade microbiana aérea, e dos processos através dos quais estas funções são afetadas pelas condições ambientais e pelas atividades humanas (GANDOLFI et al., 2013; FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016; GOLLAKOTA et al., 2021).

Portanto, com base no conhecimento atual, estudos sobre a diversidade contida nos aerossóis biogênicos, podem ampliar o conhecimento sobre o ciclo de vida dos bioaerossóis amazônicos, além de auxiliar a compreender a composição do microbioma e viabilidade de bioaerossóis aerotransportados, além de serem importantes para entender o papel que esses vêm exercendo sobre os ecossistemas, bem como, sua influência na formação de núcleos de gelo biológico, núcleos de condensação, ciclagem potencial de bioprecipitação e as suas interações entre a superfície e atmosfera de forma geral.

2.4 ANÁLISE DE PERFIS PROTEICOS NA ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR MALDI-TOF

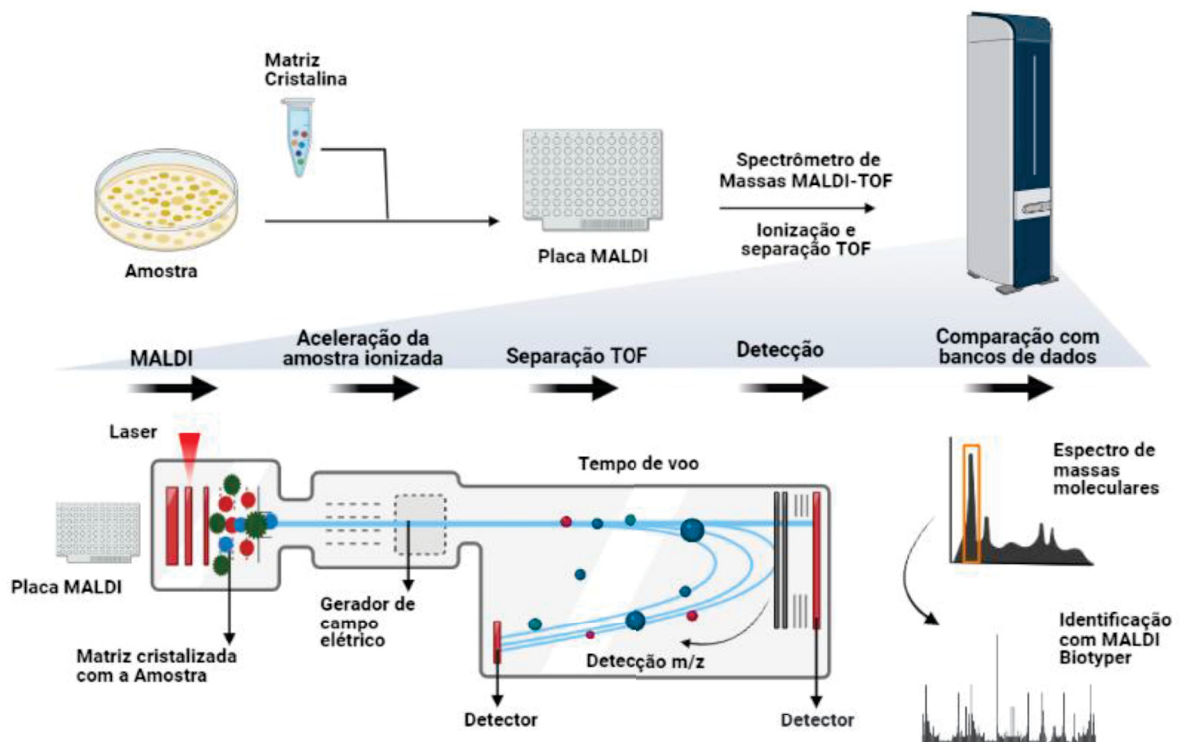
Descoberta na década de 1980, a técnica de Espectrometria de massa por MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight - Mass Spectrometer*), com dessorção a *laser* assistida por matriz em tempo de voo, vem sendo introduzida na rotina microbiológica, principalmente em pesquisas clínicas, como uma das ferramentas capazes identificar microrganismos a partir da classificação de proteínas ribossômicas, devido ao seu rápido tempo de resposta (fornecendo resultados confiáveis em menos de cinco minutos), sua alta especificidade, facilidade de uso e baixo volume de amostra (HO; REDDY, 2011; RYCHERT, 2019; OVIAÑO et al., 2021; GAJIC et al., 2022).

O princípio das análises MALDI *Biotyper* baseia-se principalmente na determinação da relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em tempo de voo, a partir dos disparos de um laser sobre a amostra revestida por uma

matriz ácida, na placa de MALDI inserida na câmara do espectrômetro de massa a serem analisados, conforme FIGURA 5 (SINGHAL et al., 2015).

Após os disparos do laser a mistura matriz/amostra é irradiada, evaporando a matriz e liberando perfis proteicos presentes na amostra. Os íons proteicos são então eletrostaticamente acelerados em um gerador de campo elétrico a uma curta distância, em direção a um detector de moléculas, viajando a uma velocidade proporcional a sua relação m/z . As moléculas com baixa massa/carga viajam mais rápido pois são mais leves, seguidas por perfis proteicos mais pesados, ocorrendo dessa forma a separação das moléculas pela massa molecular. Assim o espectro de massa é gerado, representando uma impressão digital molecular a partir do número de íons que atingem o detector ao longo do tempo (PATEL, 2015; SINGHAL et al., 2015).

FIGURA 5 – ESQUEMA DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS A PARTIR DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR MALDI-TOF E BIOTYPER



FONTE: AUTORA (2023).

Segundo Souza (2019), para identificação de cada perfil proteico ou impressão digital do analito, gerados a partir da análise em MALDI-TOF MS, necessita-se comparar o resultado obtido com perfis dos espectros de referência, denominados MSP (*Main Spectra Projections* - Perfil de espectro principal), presentes na biblioteca

IVD (*In Vitro Diagnostic System, Bruker Daltonics*) integrada, por meio do algoritmo *Biotyper*. Desse modo, a identificação dos organismos ocorre por similaridade dos perfis proteicos, identificados a partir dos picos de massas moleculares que são específicos para o gênero, espécie, e por vezes as subespécies (SOUZA, 2019; CARBONNELLE et al., 2011).

É preciso mencionar que a análise em MALDI-TOF, assim como qualquer outra, possui benefícios e limitações, desse modo, embora existam plataformas de espectrometria de massa por MALDI-TOF capazes de identificar organismos de forma mais rápida e barata, a identificação bem-sucedida de microrganismos depende muito do banco de dados que contém os espectros de organismos conhecidos, sendo esses abastecidos principalmente por microrganismos presentes em análises clínicas, e com baixa disponibilidade espectros de microrganismos ambientais (SINGHAL et al., 2015; RYCHERT, 2019; SOUZA, 2019).

No entanto, a utilização desse método trouxe identificação mais oportuna e precisa de microrganismos, o que vem aumentando sua utilização gradativa nos últimos dez anos e por consequência as plataformas têm apresentado melhoras progressivamente. Conforme essas plataformas continuarem a se aperfeiçoar e tornando-se cada vez mais disponíveis em breve, ajudar o MALDI-TOF poderá contribuir para realização de tarefas importantes que atualmente exigem métodos lentos e trabalhosos (RYCHERT, 2019; OVIAÑO et al., 2021).

2.5 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE FUNGOS E BACTÉRIAS

A ciência da taxonomia diz respeito à classificação dos seres vivos e é caracterizada como uma ferramenta básica utilizada por pesquisadores para identificar organismos utilizando uma linguagem universal de comunicação e de referência comum (TORTORA, 2017).

A classificação taxonômica estabelece categorias (táxons) para mostrar as relações e semelhanças entre os organismos estudados. Sendo útil para determinar as relações de parentesco entre diferentes grupos, permitindo sua diferenciação. Os táxons são organizados hierarquicamente, refletindo suas relações filogenéticas. Um gênero é composto por várias espécies, gêneros relacionados formam uma família, famílias similares são agrupadas em ordens, ordens semelhantes formam classes,

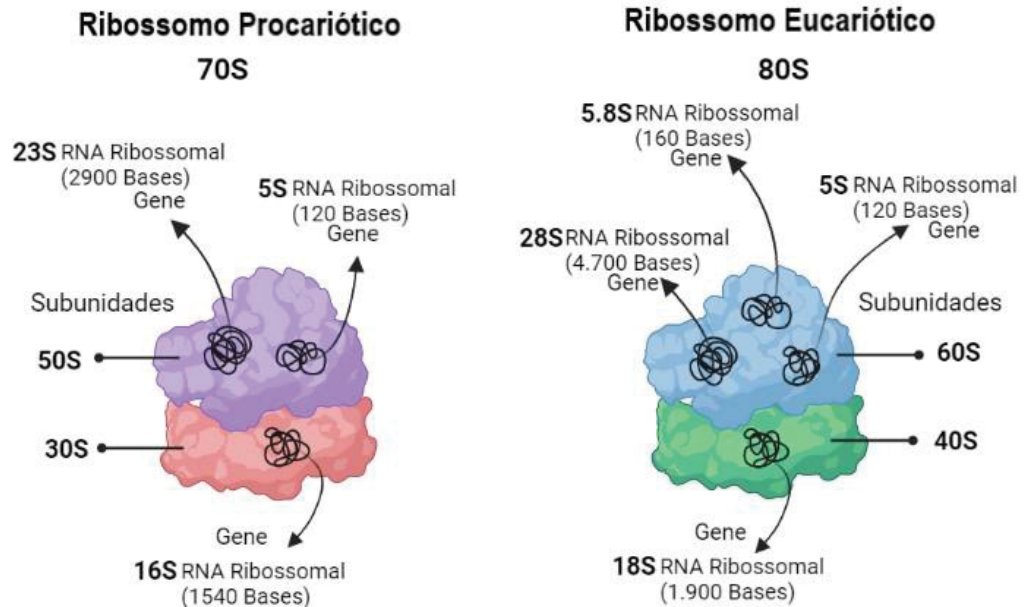
classes relacionadas constituem filós, filós relacionados compõem reinos e, por fim, os reinos são agrupados em domínios (TORTORA, 2017). Essa hierarquia reflete as relações evolutivas entre os organismos. Embora existam métodos de atribuição taxonômica mais antigos e com bom desempenho, os campos da ecologia, evolução e conservação estão sendo transformados por novos recursos e técnicas nas ciências biológicas (GOSTEL; KRESS, 2022).

O processo de identificação do gênero ou espécie de um organismo, pode ocorrer atualmente por diferentes tipos de metodologias, no entanto, uma das técnicas mais utilizadas nesse processo é amplificação de um gene específico para determinado tipo de microrganismo através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), seguida do sequenciamento do DNA amplificado (KOCHER; WILSON, 1991; SOUZA, 2019; GOSTEL; KRESS, 2022).

Para a maioria das pesquisas sobre biodiversidade, a confiabilidade e a repetibilidade dos testes de hipóteses dependem de identificações precisas das espécies sob investigação, neste sentido, a escolha do gene a ser utilizado é uma das etapas mais críticas na análise, uma vez que é fundamental para avançar na compreensão de como as espécies evoluem, interagem e de como retardar a sua extinção (GOSTEL; KRESS, 2022).

De uma forma geral, para a identificação molecular de microrganismos, são utilizados genes específicos para cada microrganismo a partir da escolha do gene do RNA ribossomal de procariotos (70S) e eucariotos (80S) conforme FIGURA 6. Os ribossomos são compostos de duas subunidades, sendo cada qual consistindo em proteína e de um tipo de RNA, denominado RNA ribossomal (rRNA). Os ribossomos procarióticos e eucarióticos diferem principalmente no número de proteínas e de moléculas de rRNA contidas no complexo ribossomal, os procarióticos são um pouco menores e menos densos do que os ribossomos das células eucarióticas (TORTORA, 2017).

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO RIBOSSOMAL 70S E 80S



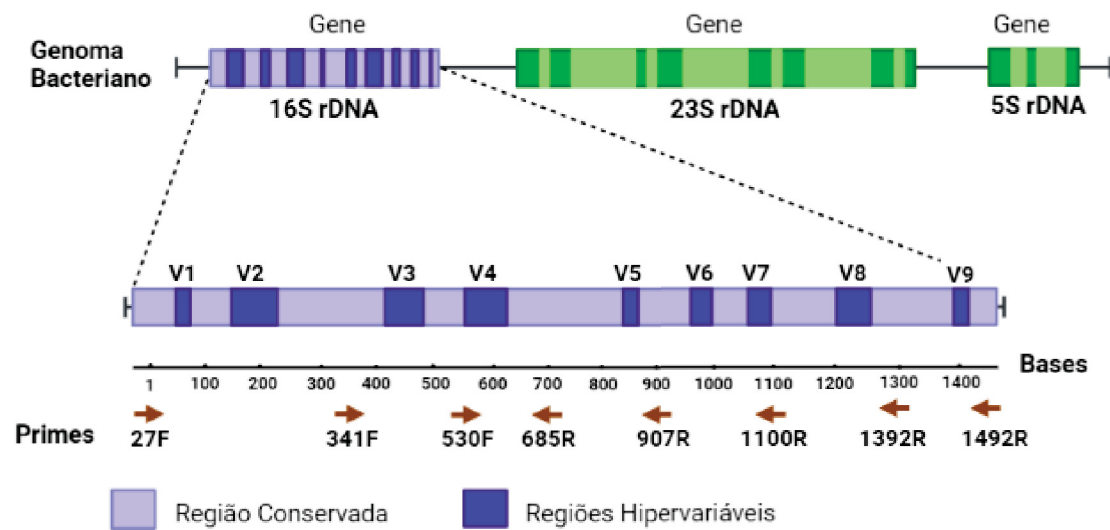
FONTE: AUTORA (2023).

Os ribossomos procarióticos possuem uma subunidade menor 30S e uma subunidade maior 50S, que constituem a unidade 70S completa do ribossomo conforme FIGURA 6 (TORTORA, 2017). Presente na subunidade 30S, a molécula 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) se destaca como o gene mais amplamente utilizado em estudos científicos de sequenciamento para a identificação de procarióticos ao nível de gênero (SOUZA, 2019).

O gene 16S rRNA possui cerca de 1500 pares de base (pb), compreendendo nove regiões (V1 a V9) hipervariáveis intercaladas ao longo da sequência 16S altamente conservada conforme FIGURA 7 (FUKUDA et al., 2016; JOHNSON et al., 2019), sendo as regiões V1 – V4 totais ou parciais favorecidas para estudar comunidades bacterianas presentes na atmosfera (SOUZA, 2019).

Entre as principais características do 16S rRNA, destaca-se o fato de possuir uma gama de primers para discriminação de vários grupos taxonômicos; um tamanho grande o bastante que possibilita o possível surgimento de divergências na sequência; possuir uma estrutura e função bem conservadas, além de uma base de dados extensa para classificação filogenética (FAORO, 2006; FUKUDA et al., 2016; SOUZA, 2019). Estas características permitem que a sequência de bases do gene 16S rRNA sirva como ferramenta no estudo da evolução e ecologia dos microrganismos (ACINAS et al., 2004).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA BACTERIANO E GENE 16S rRNA



FONTE: Adaptado de FUKUDA et al., 2016.

Os ribossomos eucarióticos, apresentam uma subunidade maior denominada 60S, a qual contém três moléculas de rRNA (28S rRNA; 5S rRNA; 5.8 rRNA) e uma subunidade menor denominada 40S, com uma molécula de rRNA (18S rRNA) (FIGURA 6) (TORTORA, 2017).

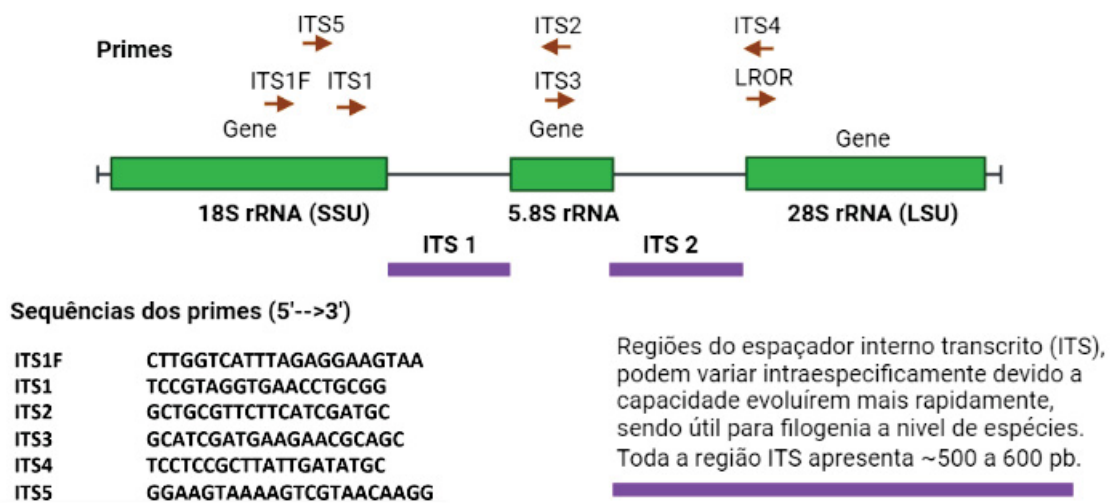
Para a identificação de eucariotos fúngicos, os três genes ribossomais nucleares mais comumente utilizados na identificação de fungos são os genes 18S rDNA (SSU), 28S rDNA (LSU), 5.8S e as regiões do espaçador interno transcrito (ITS), sendo esse último descrito na literatura como o mais utilizado na identificação da maioria dos táxons fúngicos (RAJA, et al., 2017).

A região ITS é composta por duas regiões espaçadoras intergênicas variáveis, que se encontram entre as áreas altamente conservadas do gene ribossomal 5.8S e são denominadas de região ITS1, que está localizada entre os genes 18S e 5.8S, e a região ITS2 que separa os 5.8S e o gene 28S como é possível observar na FIGURA 8 (MENEZES et al., 2010; HOANG et al., 2019).

Enquanto as regiões dos genes ribossomais 18S, 28S, e 5.8S são mais conservadas dentro da espécie, as regiões dos espaçadores ITS, podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento, devido a capacidade evoluírem mais rapidamente (HILLIS; DIXON, 1991; MENEZES et al., 2010; RAJA, et al., 2017).

A região ITS apresenta cerca de 500 a 650 pb (pares de bases) e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos (primers), sendo os mais utilizados ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, e ITS5, em função da facilidade de amplificação e variabilidade genética, o sequenciamento baseado nestas regiões demonstrou eficiência em diversos estudos, sendo então escolhido por micologista como o código de barra (*barcode*) oficial para identificação de fungos em nível de gênero e espécies (WHITE et al., 1990; SCHOCH et al., 2012; RAJA et al., 2017).

FIGURA 8 – REGIÕES DO ESPAÇADOR INTERNO TRANSCRITO (ITS)



FONTE: Adaptado de RAJA et al. (2017).

2.6 POTENCIALIDADES PARA O USO SUSTENTÁVEL: UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.

O conceito de sustentabilidade começou a ser apresentado ao mundo na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente Humano (*United Nations Conference on the Human Environment* – UNCHE), realizada na cidade de Estocolmo na Suécia em 1972, a partir da preocupação global a cerca de degradação ambiental causada pelas atividades humanas (UNCHE, 1972).

Mais tarde na década de 1980, o conceito de desenvolvimento sustentável foi divulgado no relatório “Nosso Futuro Comum” (Relatório Brundtland) da ONU em 1987, o qual definiu o Desenvolvimento Sustentável como aquele que satisfaz as necessidades das gerações atuais sem comprometer as gerações futuras de suprir

suas próprias necessidades. Para Sachs (1981 p.14), “Trata-se de gerir a natureza de forma a assegurar aos homens de nossa geração e a todas as gerações futuras a possibilidade de se desenvolver”.

No entanto, estabelecer sistemas de aproveitamento econômico da biodiversidade, com essas características se torna uma das maiores dificuldades da atualidade, uma vez que, o bem-estar da humanidade está atrelado a utilização dos recursos biológicos (PEIXOTO, 2016). Ainda segundo Peixoto (2016):

A sustentabilidade ocorre quando a exploração da natureza é feita dentro de limites que não comprometem o seu funcionamento e sua perpetuação. Se é fato que as atividades humanas envolvem impactos ambientais negativos, também é verdade que existem muitas ações capazes de identificar, minimizar e compensar esses impactos, reduzindo os conflitos de uso (PEIXOTO, 2016, p. 183).

Nesse sentido, a bioprospecção surge como estratégia para a conservação e uso sustentável dos recursos naturais brasileiros, pois permite a utilização econômica de extratos e moléculas de microrganismos, plantas e animais obtidos a partir da pesquisa científica (CONFORTIN, 2019; SILVA et al., 2022). A bioprospecção de uma forma geral, é definida como a busca de compostos orgânicos bioativos que sejam úteis para a humanidade. Os recursos naturais, podem ser definidos como uma reserva pré-existente, de recursos limitados como florestas, microrganismos, solos, jazidas de minerais, rios e lagos etc. (DENARDIN et al., 2021).

A partir da bioprospecção, a ciência e os cientistas podem identificar novos usos para os inúmeros recursos oferecidos pelos ecossistemas, contribuindo diretamente para a compreensão do papel desses recursos na produtividade dos sistemas ecológicos, uma vez que, além do papel exercido por cada espécie, seu conjunto, assim como as interações com o meio podem exercer funções fundamentais para a manutenção dos serviços ecossistêmicos (JOLY et al., 2011).

Segundo Joly et al., (2022, p. 28) viver em “equilíbrio com a natureza” significa respeitar os outros seres vivos e conviver de forma harmônica e sinérgica com as outras espécies e nosso planeta. Considerando que a biodiversidade potencializa uma ampla gama de serviços ecossistêmicos que nos beneficia, a biodiversidade deveria ser entendida como um ativo para o desenvolvimento sustentável e para o nosso bem-estar, e não apenas algo a ser conservado e apartado do convívio (ou das interferências) da sociedade.

Desse modo, fica claro que a biodiversidade possui um papel fundamental nas soluções para o desenvolvimento sustentável (SILVA et al., 2022). Assim, é possível

evidenciar as muitas possibilidades de conservar a biodiversidade e ainda se beneficiar desse importante ativo para promover a sustentabilidade nas suas múltiplas dimensões (SACHS, 1986), além de contribuir para uma nova economia, gerando riquezas a partir da vegetação nativa e de sua biodiversidade, e não apenas em detrimento dela (JOLY et al., 2022).

É no reconhecimento dos potenciais de aplicações dos recursos naturais, que se mensuram os benefícios advindos do uso do mesmo, relacionando os fluxos de bens de consumo oferecidos pela natureza, atividades econômicas e humanas, somente assim, é possível tornar sustentável o uso dos recursos naturais no presente, ou seja, garantir seu uso também no futuro (MOTA, 2006).

De acordo com Joly (2022), o fato mais interessante sobre a biodiversidade é que ainda existem muitas sinergias a serem exploradas, dado que ações que promovem maior biodiversidade são também as mesmas que aumentam nossa resiliência climática, ampliam nossa segurança hídrica, tornam nossas paisagens produtivas e nossas cidades mais sustentáveis.

Um exemplo de benefício promovido em decorrência do estudo da biodiversidade é a inovação produzida a partir da ciência da biotecnologia, que busca na biodiversidade ou diversidade biológica e genética, a partir da bioprospecção a base para diversas aplicações, através da evolução técnico-científica, de manipulação biotecnológica ao nível microscópico, buscando potencializar seus usos e aplicações (como biocontrole e melhoramento genético para evitar danos e pragas a plantas e hortaliças), permitindo a utilização dos recursos naturais, ampliando o interesse de diferentes ramos da indústria e da economia na biodiversidade como capital natural de realização futura (ALBAGLI, 1998).

Na microbiologia, a bioprospecção e o aperfeiçoamento das técnicas de biotecnologia nos últimos anos, possibilitou uma revolução na microbiologia industrial, tornando possível aplicações úteis de atividades biológicas produzidas por microrganismos, como na produção de alimentos como pães, vinhos, cervejas e queijos permitindo melhores métodos de conservação, na biorremediação com a desintoxicação ou degradação de poluentes como petróleo por micróbios em condições aeróbias, o melhoramento agrícola como a fixação biológica de nitrogênio por bactérias que proporcionam a diminuição de fertilizantes químicos no solo, diminuindo conseqüentemente a degradação ambiental por esses causada, e as

aplicações industriais como utilização de metabólitos secundários com atividades biológicas para aplicações farmacêuticas (TORTORA, 2017; JOLY, 2022).

Segundo Danquah et al. (2022) entre os grupos de compostos bioativos com atividade inibitória derivados de microrganismos estão os peptídeos cíclicos, formados por (mathiapeptídeo A, destotamida B, Marfomicinas A, B, E; espirotetronatos policetídeos-abissomicina C, Lobofoquina F, H, bem como alcalóides e derivados sesquiterpenos, caboxamixina e mafuraquinocinas A, D) derivados de bactérias, também os análogos do ácido ambuico, as classes dos penicilones; análogos de depsidona, os grupos spitomastixones; derivados de xantonas, emerixantonas e os derivados de fungos como os engyodontiumsones, Enfumafungina, favolon, Coprinuslactona, Ácido microporênico A, Rubrolide S, Cladosina C, Tripilepirazinol e β -hidroxiergosta-8,14,24 (28)-trien-7-ona.

Para Joly (2022), a biodiversidade terrestre é uma fonte rica de metabólitos secundários, em virtude de sua variedade e complexidade molecular. Os metabólitos secundários, formados por vias metabólicas complexas, desempenham papéis importantes na regulação de diversas funções para as interações entre organismos e o meio biótico e abiótico, tais como: atividades de resistência contra pragas e doenças, atração de polinizadores e interação com microrganismos simbióticos.

Essas atividades possuem um papel importante na manutenção da biodiversidade, e pode ser examinada para obtenção de inovações biotecnológicas, a fim de contribuir para o uso sustentável desses recursos, na medida em que esses podem vir a substituir o uso de substâncias sintéticas (DENARDIN et al., 2021) que agridem o meio ambiente e geram inúmeros malefícios aos diversos ecossistemas terrestres e aquáticos.

Deste modo, se faz necessário garantir a utilização da diversidade biológica tanto no avanço da biologia da conservação, como no desenvolvimento de mecanismos que viabilizem o uso sustentável desse patrimônio natural (JOLY et al., 2011). Para isso, é fundamental entender que os serviços ecossistêmicos podem ser aplicados como base para iniciativas baseadas na natureza e no funcionamento dos ecossistemas, ao utilizar de maneira inteligente e se beneficiar dos recursos naturais dos ecossistemas, sem prejudicá-los. (PAULI, 2020). Neste sentido vale fazer menção às palavras de Denardin et al., (2021, p. 65).

A natureza (recursos renováveis e não renováveis) ingressa no sistema de produção e consumo como matéria prima, a natureza enquanto fonte

provedora, e atua, também, como fossa receptora de dejetos, matéria e energia. No entanto, a natureza provê importantes serviços ecossistêmicos, insubstituíveis, que permitem a continuidade da vida humana e não humana no planeta. A dimensão natural [...] pode ser operacionalizada mediante práticas de produção e consumo sustentáveis na relação homem-natureza.

Sendo assim, para considerar a biodiversidade como base para utilização sustentável dos recursos naturais seria preciso considerar seu limite físico como uma fonte de recurso que pode ser esgotável, buscando conservar a diversidade biológica, utilizando os recursos naturais a uma taxa que não exceda seu ritmo de regeneração e pensando também na quantidade de resíduos excedentes gerados no decorrer do processo, gerando resíduos na medida que o ecossistema seja capaz de assimilar ou reciclar (DENARDIN et al., 2021; HAUWERMEIREN, 1998).

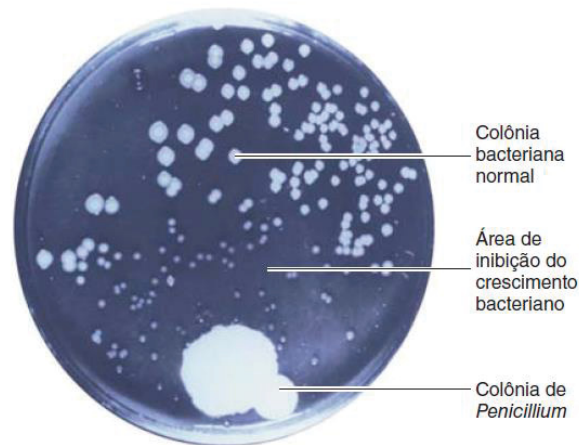
2.6.1 Atividade antimicrobiana

A pesquisa por agentes antimicrobianos e a subsequente descoberta dos antibióticos no início do século XX, foi uma das mais importantes conquistas da história da medicina. Com mais de 100 anos de história, a descrição de atividade antimicrobiana, teve início antes mesmo do século XX, desde 1870, John Scott Burdon-Sanderson relatou o fluido de cultura coberto por um mofo que inibia o crescimento de bactérias, um ano depois, Joseph Lister, utilizando *Penicillium glaucium*, demonstrou o efeito antibacteriano em tecidos humanos (GOULD, 2016). Anos depois em 1897, Ernest Duchesne um médico francês, observou cavaleiros árabes tratando feridas de sela com mofo propagado em suas selas (GOULD, 2016). Usando uma suspensão do mofo isolado *Penicillium notatum*, para tratar com sucesso a febre tifóide induzida em cobaias, resultando na sobrevivência de todos os animais medicados (MOHR, 2016).

Mas foi Alexander Fleming em 1928, que a pesquisa com agentes antimicrobianos com potencial para inibição de microrganismos ganhou notoriedade, Fleming observou que um bolor havia acidentalmente contaminado a placa de Petri previamente inoculada com a bactéria *Staphylococcus aureus*, o bolor posteriormente identificado como *Penicillium notatum* havia inibido crescimento em uma área que circundava as colônias da bactéria, logo depois seu composto bioativo foi isolado e denominado de penicilina, os resultados da pesquisa de Fleming foram publicados no

British Journal of Experimental Pathology um ano depois (FIGURA 9) (FLEMING, 1929; MOHR, 2016; GOULD, 2016; TORTORA, 2017).

FIGURA 9 – A DESCOBERTA DA PENICILINA



Fonte: TORTORA (2017).

LEGENDA: Fotografia documentada por Alexander Fleming em 1928, quando acidentalmente uma placa foi contaminada com o fungo *Penicillium*, que inibiu o crescimento das bactérias adjacentes.

O uso da penicilina só se tornou possível 10 anos mais tarde, sendo o primeiro antibiótico capaz de matar bactérias Gram-positivas, incluindo os patógenos que causavam gonorreia, sífilis e infecções puerperais (MOHR, 2016). Após Fleming, muitos antibióticos foram descritos ao longo dos anos, desde os obtidos a partir metabólitos bioativos produzidos pelo metabolismo secundário de bactérias e fungos, como os derivados de compostos sintéticos (DEMAIN, 2000; TORTORA, 2017).

No entanto, observou-se que os micróbios antes tratados com os antibióticos começaram a desenvolver, adquirir e disseminar inúmeros mecanismos de resistência, essa característica que resulta de mudanças genéticas, tornam alguns microrganismos capazes, por exemplo, de produzir enzimas que inativam os antibióticos, ou alteram a superfície da membrana e impedem a ligação ou a entrada de um fármaco, tornando os micróbios capazes de tolerar uma certa quantidade de um determinado antibiótico, que anteriormente seria capaz de inibir seu crescimento, essa habilidade adquirida logo é repassada por meio da troca de informações gênicas (TORTORA, 2017; MOHR, 2016).

O crescente número de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado atualmente vem se tornado um grave problema, pois a resistência leva ao surgimento de estirpes mais virulentas, com habilidade de vencer o mecanismo natural de defesa do organismo, com a capacidade

de se tornarem patogênicos, mesmo quando presentes em baixo número (MACHADO et al., 2015; GAJIC et al., 2022).

Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (WHO, 2019), a resistência antimicrobiana se tornou a preocupação mais urgente em saúde pública ao nível global, subindo cada vez mais para níveis altos em todas as partes do mundo, desencadeando um aumento de morbidade e mortalidade, somente os seis principais patógenos conhecidos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* foram responsáveis 3,57 milhões de mortes associadas à resistência em 2019, segundo estimativas da OMS é possível que esse número possa subir para 10 milhões até 2050 (WHO, 2019; MURRAY et al, 2022).

Diante deste contexto, esforços para descobrir novas substâncias antimicrobianas e identificar alternativas para o controle de microrganismos resistentes a partir de fontes naturais vêm progredindo consideravelmente (DUARTE, 2006). Substâncias com potencial antimicrobiano são definidas, como compostos que possuem a habilidade de causar a morte ou inibição no crescimento microbiano de variadas formas (SOUZA, 2002).

Os microrganismos são conhecidos como uma fonte inexplorável de biomoléculas, com potencial promissor de atividade antimicrobiana estrutural e funcional, principalmente os fungos e bactérias (DANQUAH et al., 2022). Desde a descoberta da penicilina em 1928, vários microrganismos vêm sendo testados, pois, alguns possuem a capacidade de liberar compostos bioativos úteis, por meio de seu metabolismo secundário, capazes de realizar a inibição do crescimento de microrganismos, diversos fármacos antimicrobianos são derivados de fontes naturais e provenientes do metabolismo secundário de microrganismos, como o cloranfenicol, a nistatina, e outros (HEATLEY,1944; SERRA, 2010, DEMAINE, 2014; TORTORA, 2017).

Os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos podem agir de diferentes maneiras no organismo alvo, podendo agir inibindo a síntese de proteína, alterando da parede celular bacteriana, alterando na membrana plasmática, inibindo a síntese de RNA, ou bloqueando a replicação e reparo do DNA, fazendo com que ocorra a lise celular pela liberação do conteúdo celular e conseqüentemente a morte (TORTORA, 2017; ALLEMAILEM, 2021).

Os metabólitos secundários, incluindo compostos bioativos são produzidos na natureza por microrganismos e plantas e desempenham funções de sobrevivência para os organismos que os produzem, eles servem como mecanismos de defesa usados contra outras bactérias, fungos, insetos ou grandes animais, plantas e amebas, também servem como agentes transportadores de metais; bem como agentes de simbiose entre micróbios e plantas (DEMAIN, 2000).

Como a microbiota de bioaerossóis é composta por uma predominância de fungos e bactérias, esses microrganismos aéreos, podem apresentar um conteúdo promissor para investigação de atividade biológica de metabólitos secundários, uma vez que pouco se sabe sobre cientificamente sobre seu potencial. No entanto, encontrar compostos ativos de origem natural que tenham o poder de inibir microrganismos, não é uma tarefa fácil, a grande maioria dos que foram descobertos ou que ainda estão sendo encontrados não são úteis, alguns apresentam altos níveis de toxicidade ou são inativados no organismo alvo.

Tortora (2017) relatou um estudo que analisou 400 mil culturas microbianas gerou apenas três fármacos utilizáveis, esse fator limitante evidenciado, por exemplo, pelos actinomicetos, cerca de 1 a cada 100 actinomicetos do solo produzem estreptomicina, e 1 a cada 250 produzem tetraciclina (TORTORA, 2017). Outro fator limitante é o fato de que o lançamento de antibióticos atualmente é muito mais complicado e lento do que há cem anos (MOHR, 2016; GOULD, 2016; TORTORA, 2017).

Considerando a relevância dos dados acima mencionadas, uma das técnicas mais utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana, é o teste de difusão em disco, este se destaca, por ser padronizado para testar a suscetibilidade de bactérias a agentes antimicrobianos e se tornar desde sua criação um método padrão na realização testes de antibiograma em laboratórios de microbiologia, devido ao seu baixo custo e facilidade de execução, além da possibilidade de aplicabilidade em inúmeras espécies bacterianas e antibióticos (LE et al., 2016; GAJIC et al., 2022).

Seu princípio de atuação, baseia-se na colocação de diferentes discos impregnados com agentes antimicrobianos a serem testados em ágar previamente inoculado com suspensão bacteriana a ser avaliada, em geral, testados frente a organismos patogênicos, após o tempo de incubação (24h a 35 ± 1 °C) é possível observar os halos de inibição (BAUER et al., 1966; LE et al., 2016; GAJIC et al., 2022).

Desde o pontapé inicial na história dos antibióticos e na corrida contra a resistência aos efeitos dos antibióticos, esforços são feitos para alcançar todos os cantos do globo, na busca por novas fontes, considerando o fato de que os avanços na descoberta de antibióticos foram resultados do isolamento de microrganismos provenientes principalmente de amostras ambientais, no entanto, parte desses habitats naturais onde esses microrganismos podem ser encontrados estão sendo desgastados pelo desmatamento e pelo aquecimento global. Desse modo, pode não sobrar muito tempo para novas descobertas (GOULD, 2016).

REFERÊNCIAS

- ALBAGLI S. Da biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação. **Ci. Inf.**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 7-10, jan./abr. 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-19651998000100002>>. Acesso em: 03/10/2022.
- ACINAS, S. G. et al. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **J. Bacteriol**, Cambridge, v.186, n. 9, p.2629–2635, 2004.
- ALLEMAILEM, K.S. Antimicrobial Potential of Naturally Occurring Bioactive Secondary Metabolites. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 13, n. 2, 2021. J Pharm Bioallied Sci. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34349474/>>. Acesso em: 15/12/2022.
- ALVES, J. E. D. **Antropoceno: a Era do colapso ambiental**. Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz Antônio Ivo de Carvalho (CEE-FIOCRUZ). 16 jan. 2020. Disponível em:< <https://cee.fiocruz.br/?q=node/1106>>. Acesso em: 30/11/2021.
- 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: 30/11/2021.
- ANDREAE, M. O., Rosenfeld, D., Artaxo, P., Costa, A. A., Frank, G. P., Longo, K. M., and Silva-Dias, M. A. F.: Smoking rain clouds over the Amazon, **Science**, 303, 1337–1342, 2004.
- ARANA, A. **A composição elementar do aerossol atmosférico em Manaus e Balbina**. 2009. 98p. Dissertação (Mestrado em Clima e Ambiente) – Instituto de Pesquisas da Amazônia INPA, Manaus, 2009.
- ARTAXO, P.; GATTI, L.V.; CORDOVA, A.M.; LONGO, K.M.; FREITAS, S.R.; LARA, L.L.; PAULIQUEVIS, T.M.; PROCOPIO, A.S.; RIZZO, L.V. Química atmosférica na Amazônia: a floresta e as emissões de queimadas controlando a composição da atmosfera amazônica. **Acta amazônica**, v. 35, n. 2, p. 185-196, 2005.
- ARTAXO, P.; RIZZO, L.V.; PAIXÃO, M.A.; LUCCA, S.; OLIVEIRA, P.; LARA, L.L.; WIEDEMANN, K.R.; ANDREAE, M.O.; HOLBEN, B.; SCHAFER, J.; CORREIA, L.A.; PAULIQUEVIS, T.M. Partículas de aerossóis na Amazônia: composição, papel no balanço de radiação, formação de nuvem e ciclos de nutrientes. doi:10.1029/2008GM000778. **Amazonia and global change, Geophysical monograph series**. 186, p. 233-250, 2009.
- ARTAXO, P., Rizzo, L. V., Brito, J. F., Barbosa, H. M. J., Arana, A., Sena, E. T., Cirino, G. G., Bastos, W., Martin, S. T., & Andreae, M. O. Atmospheric aerosols in Amazonia and land use change: From natural biogenic to biomass burning conditions. **Faraday Discussions**, 165, 203, 2013.

ARTAXO, P. Uma nova era geológica em nosso planeta: o Antropoceno? **Revista USP**. n. 103, p. 13-24. 2014.

ATTO. Gallery - ATTO - Amazon Tall Tower Observatory. Disponível em: <<https://www.attoproject.org/pt/multimedia/gallery/>>. Acesso em: 17/12/2022.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **ARPA Biodiversidade**. 2012. Disponível em: <http://arpa.mma.gov.br/wp-content/uploads/2012/10/arpaBiodiversidade.pdf>. Acesso em: 05/08/2022.

Barbosa, CGG, Taylor, PE, Sá, MO et al. Identificação e quantificação de partículas gigantes de bioaerossóis sobre a floresta amazônica. **Npj Clim Atmos Sci**. v. 5, n. 73, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41612-022-00294-y>>. Acesso em: 22/05/2023.

BAUER, A. W. KIRBY, W. M. SHERRIS, J. C. TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**. 1966 Apr;45(4):493-6. PMID: 5325707.

BPBES - Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos. 1º Diagnóstico brasileiro de biodiversidade & serviços ecossistêmicos. [livro eletrônico]. -- São Carlos, SP: **Editora Cubo**, 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: 20/06/2022.

COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO (CMMAD). **Nosso futuro comum**. Rio de Janeiro: Fundação Getulio Vargas, 1988.

CONFORTIN, C. **Valorização de plantas aromáticas nativas do bioma Mata Atlântica – estudo fitoquímico e biológico do óleo essencial de duas espécies da família Myrtaceae no litoral do Paraná**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Territorial Sustentável) – Setor Litoral, Universidade Federal do Paraná. Matinhos, 2019.

CORREIA, F.W.; ALVALÁ, R.; MANZI, A. Impactos das modificações da cobertura vegetal no balanço de água na Amazônia: um estudo com modelo de circulação geral da atmosfera MCGA. **Revista brasileira de meteorologia**, v. 21, n. 3a, p. 153-167, 2006.

COSTA, A.A.; PAULIQUEVIS, T.M. Aerossóis, nuvens e clima: resultados do experimento LBA para o estudo de aerossóis e microfísica de nuvens. **Revista brasileira de meteorologia**, v. 24, n. 2, p. 234-253, 2009.

COSTA, V. A. A narrative review of papers developed on the Amazon Tall Tower Observatory experimental site. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 14, p. e73101421749, 2021. Disponível em: <DOI:10.33448/rsd-v10i14.21749>. Acesso em: 05/08/2022.

CRUTZEN, P. J.; STOERMER, E. F. The “Anthropocene”. **Global Change Newsletter**. I G B P Newsletter, n. 41, p. 17-18, maio. 2000.

CRUTZEN, P. J. The “Anthropocene”. **J. Phys. IV France**, v. 12, n. 10, p. 13-18, novembro. 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Programa Nacional de Conservação da Biodiversidade. **A Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB**. 1992. Disponível em: <http://www.onu.org.br/rio20/img/2012/01/cdb_ptbr.pdf>. Acesso em: 03/06/2022.

DANQUAH, C. A. et al. Antimicrobial Compounds from Microorganisms. **Antibiotics**. v.11 n. 285, p. 1-20, 2022. Disponível em: <doi: 10.3390/antibiotics11030285>. Acesso em: 23/05/2023.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The Natural Functions of Secondary Metabolites. **History of Modern Biotechnology I**, p. 1–39, 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-44964-7_1>. Acesso em: 15/12/2022

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, p. 185–201, 2014.

DESPRÉS, V. R., HUFFMAN, A. J. BURROWS, S. M. HOOSE, C. SAFATOV, A. S. BURYAK, G. FRÖHLICH-NOWOISKY, J. ELBERT, W. ANDREAE, M. O. PÖSCHL U. et al., Primary biological aerosol particles in the atmosphere: A review, **Tellus Ser. B Chem. Phys. Meteorol**. v. 64, n. 1, 15598. 2012.

DÍAZ, S. et al. Biodiversity Loss Threatens Human Well-Being. **Plos Biology**, v. 4, n. 8, p 1300-1305, agosto. 2006.

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: 15/06/2022.

FEARNSIDE, P.M. Desmatamento na Amazônia brasileira: História, índices e consequências. **Megadiversidade**, 1(4): 113-123, 2005.

FEARNSIDE, P. M. Manutenção da Floresta Amazônica como fonte de serviços ambientais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, mar. 2008. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652008000100006>.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226–236, 1929. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/>>. Acesso em: 15/12/2022.

FRANCO, J. L. A. O conceito de biodiversidade e a história da biologia da conservação: da preservação da wilderness à conservação da biodiversidade. **História (São Paulo)**, v. 32, n. 2, p. 21–48, 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/his/a/LZyXDZjgmVh4ssHfPPNrGHd/?lang=pt>>. Acesso em: 16/01/2023.

FREITAS, R. C. M. NÉLSIS, C. M. NUNES, L. S. A crítica marxista ao desenvolvimento (in)sustentável. **R. Katál.** v. 15, n. 1, p. 41-51, jan./jun. 2012.

FRÖHLICH-NOWOISKY, J. et al. Bioaerosols in the earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. **Atmos. Res.** v.182, p. 346-376, dez. 2016.

GAJIC, I.; KABIC, J.; KEKIC, D.; JOVICEVIC, M.; MILENKOVIC, M.; MITIC CULAFIC, D.; TRUDIC, A.; RANIN, L.; OPAVSKI, N. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. **Antibiotics.** 11, 427, 2022.

GANDOLFI, I. et al., Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 97, p. 4727-4736, abr. 2013.

GOLLAKOTA, A. R. K. et al., Bioaerosols: Characterization, pathways, sampling strategies, and challenges to geo-environment and health. **Gondwana Research.** v.99, p 178-203, nov. 2021.

GOSTEL, M. R.; KRESS, W. J. The Expanding Role of DNA Barcodes: Indispensable Tools for Ecology, Evolution, and Conservation. **Diversity.** 14, 213, 2022.

GOULD, K. Antibiotics: from prehistory to the present day, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, Issue 3, p. 572–575, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jac/dkv484>>. Acesso em: 15/12/2022.

HAUWERMEIREN, S. V. **Manual de Economía Ecológica.** Santiago: Rosa Moreno, 1998. 265 p.

HEATLEY, N. G. Um método para o ensaio de penicilina. **Bioquímica. J.** v. 38, n. 61, 1944.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quartely Review of Biology**, Ithaca, v.66, n.4, p.411-453, 1991.

HO, Y. P.; REDDY, P. M. Advances in mass spectrometry for the identification of pathogens. **Mass. Spectrom. Rev.** 30, 1203–1224, 2011.

HOANG, M. T. V.; IRINYI, L.; CHEN, S. C. A.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Dual DNA Barcoding for the Molecular Identification of the Agents of Invasive Fungal Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01647/full>>. Acesso em: 16/12/2022.

INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL – ISA. Unidades de conservação da Amazônia brasileira: ameaças e pressões. 2015. Disponível em:

<https://www.socioambiental.org/pt-br/mapas/unidades-de-conservacao-na-amazonia-brasileira-pessoas-e-ameacas-2015>.

JOLY, C. A.; HADDAD, C.; VERDADE, L.; OLIVEIRA, M.; BOLZANI, V.; BERLINCK, R. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, p. 114, 2011.

JOHNSON, J. S.; SPAKOWICZ, D. J.; HONG, B.-Y.; et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-13036-1>>. Acesso em: 16/12/2022.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

LE PAGE, S.; DUBOURG, G.; ROLAIN, J. Evaluation of the Scan[®] 1200 as a rapid tool for reading antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion technique. **J. Antimicrob. Chemother**, 71, 3424-3431, 2016.

MACHADO, T. F.; PEREIRA, R. de C. A.; SOUSA, C.T.; BATISTA, V.C.V. Atividade antimicrobiana do óleo essencial do capim limão (*Cymbopogon citratus*) e sua interação com os componentes dos alimentos. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 33, n. 1, jan./jun. 2015.

MARTIN, S. T. et al. An overview of the Amazonian Aerosol Characterization Experiment (AMAZE-08). **Atmospheric Chemistry and Physics**, 10(23), 11415–11438, 2010.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; et al. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 132–139, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cagro/a/HjR9qvpt4zCnxFnmbQNQGcg/?lang=pt>>. Acesso em: 16/12/2022.

MÖHLER, O., DEMOTT, P. J., VALI, G., AND LEVIN, Z.: Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics, **Biogeosciences**, 4, 1059–1071, <https://doi.org/10.5194/bg-4-1059-2007>, 2007.

MOHR, K. I. History of Antibiotics Research. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, p. 237–272, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2016_499>. Acesso em: 15/12/2022.

MOTA, J.A. **O valor da natureza: economia e política dos recursos ambientais**. Rio de Janeiro: Garamond, 2006.

MURRAY, C. J.; IKUTA, K. S.; SHARARA, F.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext#%20](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext#%20)>. Acesso em: 15/12/2022.

NETO, H. R. **Biodiversidade em crise: extinções, invasões e homogeneização biótica no Antropoceno**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, 2018.

OLIVER, T. H. Biodiversity Generation and Loss. **Environmental Science**. p. 1-28, junho. 2018.

OVIÃO, M.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 39, n. 4, p. 192–200, 2021. Disponível em: <DOI: 10.1016/j.eimc.2020.02.027>. Acesso em: 16/12/2022.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 100–111, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/clinchem/article/61/1/100/5611480?login=false>>. Acesso em: 16/12/2022.

PAULIQUEVIS, T.M.; ARTAXO, P.; OLIVEIRA, P.; PAIXÃO, M.A. O papel das partículas de aerossol no funcionamento do ecossistema amazônico. **Mudanças climáticas/artigos**, p. 48-50, 2007.

PAULI, G. The Blue Economy. Disponível em: <https://www.gunterpauli.com/the-blue-economy.html>. Acesso em: jun. 2020.

PEIXOTO, A. L. (org.). **Conhecendo a biodiversidade** / Organizadores Ariane Luna Peixoto, José Roberto Pujol Luz, Marcia Aparecida de Brito. – Brasília: MCTIC, CNPq, PPBio, 2016.

PÖHLKER, C., et al. Land cover and its transformation in the backward trajectory footprint region of the Amazon Tall Tower Observatory, *Atmos. Chem. Phys.*, 19, 8425–8470, <https://doi.org/10.5194/acp-19-8425-2019>, 2019.

PÖSCHL, U. et al. Rainforest aerosols as biogenic nuclei of clouds and precipitation in the Amazon. **Science**. Sep 17;329(5998):1513-6, 2010. Disponível em: <doi: 10.1126/science.1191056>.

PORTER, T. M.; BRIAN GOLDING, G. Are similarity-or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons. **New Phytologist**, v. 192, n. 3, p. 775-782, 2011.

PRADO, R. B. Serviços ecossistêmicos: estado atual e desafios para a pesquisa na Amazônia. **Revista Terceira Margem Amazônia**. v. 6, n. especial 16, p. 11-22, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.36882/2525-4812.2021v6i16.ed.esp.p11-22>

PRASS, M. et al. Bioaerosols in the Floresta Amazônica: variações temporais e perfis verticais de Eukarya, Bacteria e Archaea, **Biogeosciences**, v. 18, p. 4873–4887, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.5194/bg-18-4873-2021>>. Acesso em: 22/05/2023.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO (PNUD). **Acompanhando a agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável: subsídios iniciais do Sistema Nações Unidas no Brasil sobre a identificação de indicadores nacionais referentes aos objetivos de desenvolvimento sustentável/ Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento**. Brasília: PNUD, 2015. Disponível em: <<https://www.br.undp.org/content/brazil/pt/home/library/ods/acompanhando-a-agenda-2030.html>>. Acesso em 30 nov. 2021.

RAJA, H.; MILLER, A. N. PEACE, C.J. OBERLIES, N.H. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**. v. 80, n. 3, p. 756–770, 2017. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>>. Acesso em: 16/12/2022.

RYCHERT, J. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. **Journal of Infectiology and Epidemiology**, v. 2, n. 4, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.29245/2689-9981/2019/4.1142>>. Acesso em: 16/12/2022.

SACHS, I. **Ecodesenvolvimento**. Crescer sem destruir. São Paulo: Vértice, 1986.

SACHS, I. **Espaços, tempos e estratégias do desenvolvimento**. São Paulo: Vértice, 1981.

SACHS, I. **A Terceira Margem: em Busca do Ecodesenvolvimento**. São Paulo: Companhia das Letras, 2009.

ŠANTL-TEMKIV, T. F. et al., Bioaerosol field measurements: Challenges and perspectives in outdoor studies. **Aerosol Sci. Technol.** 1–27. 2019.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHDORF, S.; et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1117018109>>. Acesso em: 16/12/2022.

SERRA, H. A. A História dos Antibióticos. **MedStudents**. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/historia_medicina.asp>.

SHARMA, G. Linking the conventional and emerging detection techniques for ambient bioaerosols: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. n. 18, p. 495–523, 2019. Disponível em: <10.1007/s11157-019-09506-z>. Acesso em 23/05/23.

SILVA D.; M.A.F.; COHEN, J.P.C.; GANDÚ, A.W. Interações entre nuvens, chuvas e biosfera na Amazônia. **Acta amazônica**, v. 35, n. 2, p. 215-222, 2005.

SILVA, D. H. S.; MANNOCHIO-RUSSO, H.; LAGO, J. H. G.; et al. Bioprospecting as a strategy for conservation and sustainable use of the Brazilian Flora. **Biota Neotropica**, v. 22, n. spe, 2022. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/bn/a/Pjg45cfKZ56dGLTrr68ptvt/?lang=en#>>. Acesso em: 20/12/2022.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00791/full>>. Acesso em: 16/12/2022.

SANTOS, T. et al. Os impactos do desmatamento e queimadas de origem antrópica sobre o clima da Amazônia brasileira: um estudo de revisão. **Revista Geográfica Acadêmica**. v.11. p. 157-181. 2017. Disponível em:<10.18227/1678-7226rga.v11i2.4430>.

SOUZA, F. F. C. **Análise da biodiversidade de procariotos em bioaerossóis na Estação Científica Uatumã, Amazônia**. Dissertação (Mestrado Desenvolvimento Territorial Sustentável) - Setor de Litoral, Universidade Federal do Paraná. Matinhos, 2019.

SOUZA, F. F. C. et al. Uncovering prokaryotic biodiversity within aerosols of the pristine Amazon Forest. **Science of The Total Environment**. v. 688: 83-86. 2019.

SOUZA, F. F. C. et al. Influence of seasonality on the aerosol microbiome of the Amazon rainforest. **Science of The Total Environment**. v. 760, n. 144092, ISSN 0048-969. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144092>>.

STEEGE H. T, et al. Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. **Science**, (New York, N.Y.). 342. 1243092. 2013. Disponível em:<10.1126/Science.1243092>.

TORTORA, G. J. Microbiologia [recurso eletrônico] / Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case; tradução: Danielle Soares de Oliveira Daian, Luis Fernando Marques Dorvillé ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca, Ana Paula Guedes Frazzon, Jeverson Frazzon. – 12. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2017.

VELÁSQUEZ, V. et al. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 89-99, 2007.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. **PCR Protocols**, p. 315–322, 1990. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123721808500421?via%3Dihub>>. Acesso em: 16/12/2022.

WILKIE, D. S. et al. The empty forest revisited. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** n. 1223 p.120–128. 2011.

WHO. Resistência a antibióticos. Disponível online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. (acessado em 01 de agosto de 2022).

WWF. Amazon Alive! A decade of discovery 1999 - 2009. 57p. 2010.

ZALASIEWICZ J. et al. The New World of the Anthropocene. **Environ. Sci. Technol.** v. 44, n. 07, p. 2228-2231. 2010.

ZALASIEWICZ J. et al. Are we now living in the Anthropocene? **GSA Today**. v. 18, n. 2, fevereiro. 2008.

3 CAPÍTULO II

3.1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos de uma forma geral, representam o mais rico conjunto, em termos de química e diversidade molecular presentes na natureza, no entanto, toda essa diversidade é tão vasta quanto desconhecida, estima-se que apenas uma pequena parte cerca de 0,1 e 1%, dos microrganismos seja conhecida (dependendo do habitat estudado), enquanto mais de 99% das potencialmente 10^{11} – 10^{12} espécies microbianas permanecem em completo desconhecimento (PANIZZON et al., 2015; LOCEY et al., 2016; HOFER, 2018; BODOR et al, 2020).

Embora haja muito desconhecimento em relação a muitas espécies de microrganismos, sabe-se que sua importância é fundamental para manutenção do ciclo da vida, fornecendo a base para processos ecológicos como cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos, além de produzir relações vitais entre si e com outros organismos (HUNTER-CEVERA, 1998).

Nesse contexto, aeromicrobiologia surge como a ciência que estuda a transmissão aérea e deposição de microrganismos ambientalmente relevantes, incluindo vírus, bactérias, fungos, leveduras e protozoários em ambientes internos (ambientes fechados sem muita circulação de ar) ou externos (áreas abertas), estes materiais biológicos transportados pelo ar são conhecidos como bioaerossóis (PEPPER et al., 2015; DESPRÉS et al., 2012; FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2016; ŠANTL-TEMKIV et al., 2019).

Embora, muitas pesquisas tenham enfoque na área de saúde pública, o estudo dos bioaerossóis ainda se encontra em evolução, ganhando importância em vários aspectos em diversas áreas, incluindo a ciência ambiental, mas ainda com carência de dados em ambientes de florestas (PEPPER et al., 2015; SOUZA, 2019).

Desde os primeiros estudos realizados no século XVIII sobre microbiologia, os métodos de plaqueamento tradicionais em meio de cultivo têm sido utilizados para a obtenção de culturas puras (BODOR et al., 2020). No entanto, embora os novos meios de cultura simulem o ambiente natural, adicionando nutrientes que permitem o desenvolvimento de microrganismos, infelizmente, grande parte dos micróbios permanecem incultiváveis, por não serem capazes de crescer em condições

laboratoriais (PONTES, 2007; NAKAMURA et al., 2016; HOFER, 2018; HAHN et al., 2019; BONNET et al, 2020).

Apesar disso, os métodos baseados em cultura continuam sendo necessários, para detecção, enumeração e determinação da viabilidade para aplicações biotecnológicas, permitindo entender quais as principais características e propriedades desses grupos e quais os papéis essenciais desenvolvidos nos diversos ecossistemas (PONTES, 2007; BONNET et al., 2020).

Quando aliados a técnicas moleculares como espectrometria de massas por MALDI-TOF ou métodos de sequenciamento baseados em PCR, que investigam seqüências de um gene específico, permitem estudos sobre a diversidade dos microrganismos e sua filogenia (DRISSNER et al., 2017; HAHN et al., 2019; GAJIC et al., 2022).

Diversas pesquisas têm evidenciado que a integração de múltiplos métodos de análise microbiológica constitui o caminho mais apropriado para aprimorar o conhecimento acerca da diversidade, filogenia, ecologia, evolução e taxonomia desses diminutos microrganismos. (PONTES, 2007; DRISSNER et al., 2017; HAHN et al., 2019; BONNET et al., 2020; GAJIC et al., 2022).

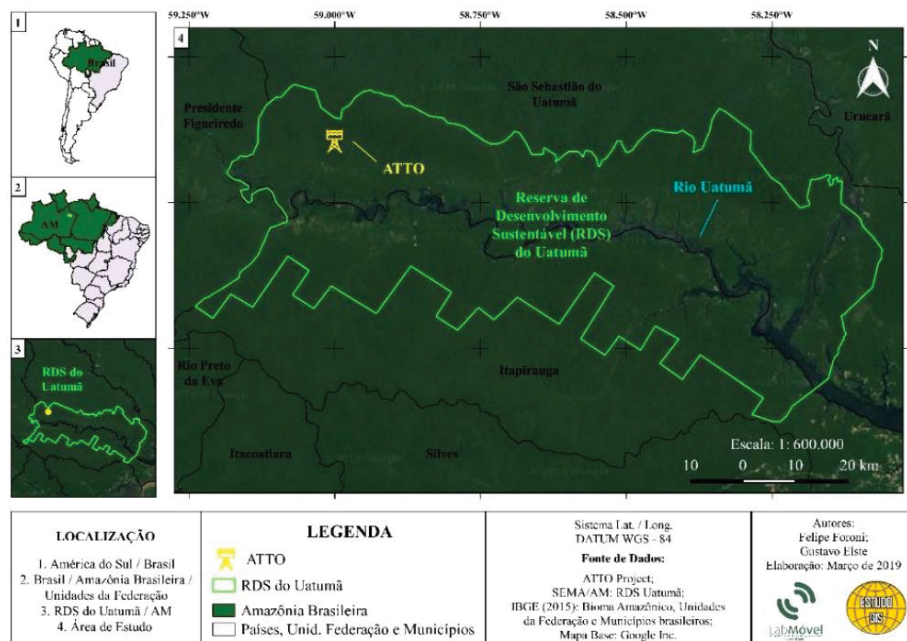
Assim este estudo, tem como objetivo, investigar os isolados de bioaerossóis cultiváveis coletados no interior da floresta amazônica em estações distintas, por meio da realização de um inventário dos isolados coletados, a fim de identificar a nível de gênero os isolados presentes no dendrograma obtido por espectrometria de MALDI-TOF, para então analisar a presença de potenciais atividades antimicrobianas nos extratos secundários de fungos e bactérias. Neste capítulo, serão abordados os aspectos metodológicos e os resultados obtidos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área de Estudo

Com o objetivo de investigar as principais dinâmicas nos processos de troca biosfera-atmosfera escolheu-se o Observatório Torre Alta da Amazônia (ATTO), que se encontra situado entre os municípios Itapiranga e São Sebastião do Uatumã, cerca de 150 km da cidade de Manaus, localizado em uma região central do estado Amazonas, inserido no interior da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã, em um local de floresta intocada (2.14395°S , 58.99987°W) conforme FIGURA 10. O projeto germano-brasileiro, criado em 2010, é constituído por três torres ao total, sendo duas torres de 80 m, que estão em funcionamento desde 2012, e uma torre de 325 m de altura finalizada em 2017.

FIGURA 10 – SÍTIO ATTO – ÁREA DE ESTUDO



Fonte: SOUZA, (2019).

A presente pesquisa dá sequência ao estudo iniciado por Felipe Foroni Cota Souza em 2018. Estiveram envolvidos na obtenção dos resultados relatados neste trabalho Felipe Foroni que realizou amostragem nos dois períodos de coleta, tendo parte dos resultados publicados em sua dissertação (SOUZA, 2019). Felipe também esteve envolvido no cultivo e isolamento de culturas puras, em parte do

sequenciamento dos isolados e nas análises de MALDI-TOF. Marcelo Conzentino e Julia Albrecht estiveram envolvidos no cultivo, isolamento e sequenciamento dos isolados. Layla Tavera esteve envolvida no sequenciamento dos isolados. Julia Albrecht esteve envolvida no cultivo e isolamento dos isolados em 2019.

Esse trabalho dá continuidade ao processo de sequenciamento dos isolados, edição dos dados obtidos por MALDI-TOF, extração e análise microbiológica dos metabólitos secundários e elaboração do inventário dos isolados de bioaerossóis dos dois períodos de amostragem.

Souza (2019) coletou amostras de ar por meio de dispositivos *Harvard Inertial Impactor* em filtros de polycarbonato *Nuclepore®* de 37 mm de diâmetro com porosidade de 0,8 µm, entre os anos de 2018 e 2019 (SOUZA et al., 2019; 2021).

As amostras da estação seca foram coletadas entre 20 e 25 de agosto de 2018 e, as amostras da estação chuvosa foram coletadas entre 20 e 24 de março de 2019 (SOUZA et al., 2019; SOUZA et al., 2021).

As amostras foram coletadas na torre *Instant* (80 metros) e nas suas proximidades a 2 m e 26 m acima do solo, ambas abaixo do dossel que pode atingir entre 30 e 40 metros de altura conforme FIGURA 11 (SOUZA et al., 2019; SOUZA et al., 2021). Nos períodos de coleta um total de nove amostras foram coletadas e enviadas para cultivo de células viáveis, sendo cinco filtros coletados durante a estação seca e quatro filtros coletados durante a estação chuvosa.

FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA



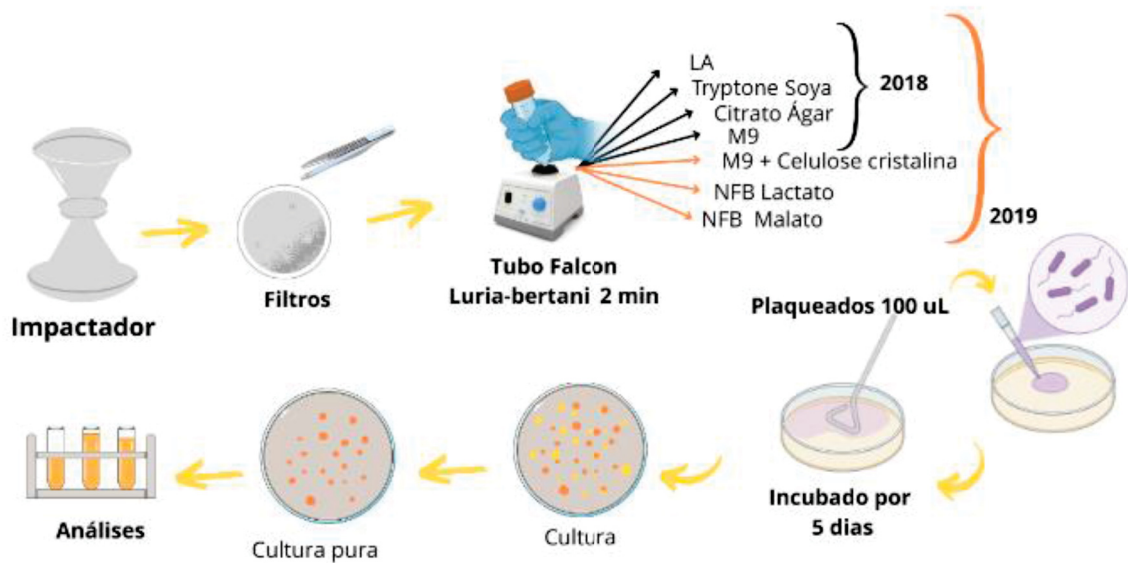
FONTE: AUTORA (2023).

Resumidamente, logo após o período de amostragem (24 horas), os filtros coletados foram colocados dentro de placas de Petri estéreis, que foram posteriormente seladas à vácuo e mantidas sob refrigeração em geladeira ou gelo em gel (durante o transporte). Foram utilizados dois filtros como controle negativo para cada estação de coleta, os quais foram deixados no interior do Impactador Harvard por 30 minutos sem fluxo de ar. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia Molecular da UFPR no Setor Litoral, para o procedimento de extração das células viáveis dos filtros amostrados conforme descrito (SOUZA et al., 2019; SOUZA et al., 2021).

3.2.2 Preparo da Amostra

Para obtenção de culturas viáveis, as amostras dos dois períodos de coletas foram tratadas conforme descrito anteriormente por Souza (2019), em que os filtros foram colocados em tubos *falcon* contendo 2 mL de meio Luria-bertani (LB), e posterior agitação em vórtex por dois minutos conforme FIGURA 12. Os filtros de controle negativo passaram pelo mesmo procedimento de extração.

FIGURA 12 – ESQUEMA DO PREPARO E CULTIVO DA AMOSTRA



FONTE: AUTORA (2023).

Após a extração em meio líquido, alíquotas de 100 µL foram espalhadas em placas Petri com meios de cultura Tryptone Soya (Himedia®); Luria-Bertani Ágar (LA); Citrate Ágar (Himedia®) e meio Mínimo M9 contendo glucose como fonte de carbono. Para as amostras coletadas em 2019 foram adicionados mais três meios de cultivo, sendo o meio Mínimo M9 com adição celulose cristalina; NFB Lactato e NFB Malato. Cujas composições estão descritas a seguir. As placas foram então incubadas a 30 °C por 120 horas, na presença de fungicida cicloheximida 0.05% (p/v), após o período de incubação, foram selecionados os isolados para obtenção de culturas puras e realização dos estoques em glicerol 50% (SOUZA, 2019).

3.2.3 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo utilizados neste trabalho serão preparados segundo Sambrook (1989), cuja composição está descrita abaixo. As soluções foram esterilizadas em autoclave.

3.2.3.1 Meio Luria-Bertani (LB)

O meio de cultura líquido Luria-Bertani empregado no cultivo das células apresenta a composição descrita na TABELA 1.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LURIA-BERTANI

Composição	Gramas/Litro
NaCl	10
Extrato de Levedura	5
Triptona	10

NOTA* Para meio Luria-Bertani Ágar (LA) adicionado 15g/L de Ágar bacteriológico.

3.2.3.2 Meio Mínimo M9 com diferentes fontes de carbono

O meio de cultura M9 utilizado no cultivo das células para teste frente a diferentes fontes de carbono apresenta a composição descrita na (TABELA 2).

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO M9

Soluções	Composição	Concentração
Sais 5x	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	64g/L
	NaCl	2,5 g/L
	NaH ₂ PO ₄	13,2 g/L
CaCl ₂	-	1 mol/L
MgSO ₄	-	1 mol/L
NH ₄ Cl	-	1 mol/L

Adicionar no momento do uso para 200 mL: 3 g de Agar bacteriológico; 150 mL de água destilada; 40 mL de sais 5x para M9; 0,4 mL MgSO₄ 1 mol/L; 10 µL CaCl₂ 1 mol/L; 4 mL de NH₄Cl 1 mol/L; 2 g/L do substrato (Concentração final 0,2%); como fonte de carbono glucose e celulose cristalina (CMC).

3.2.3.3 Meio tryptona soya (Himedia®)

Composição: Caseína enzimática hidrolisada 17,00; Fosfato hidrogênio dipotássico 2,50; Digestão papáica de farinha de soja 3,00; Cloreto de sódio 5,00; Dextrose 2,50; Extrato de levedura 6,00; Ágar 15,00 e pH final 7,3 ± 0,2 (a 25° C).

3.2.3.4 Meio Citrate ágar (Himedia®)

Composição: *Magnesium sulphate* 0.200; *Ammonium dihydrogen phosphate* 1.000; *Dipotassium phosphate* 1.000; *Sodium citrate* 2.000; *Sodium chloride* 5.000; *Bromothymol blue* 0.080; *Agar* 15.000 e pH final Final pH (25°C) 6.8±0.2.

3.2.3.5 Meio NFB-Lactato

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-LACTATO

Composição	Gramas/Litros
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻¹
NaCl	1,0 x 10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0 x 10 ⁻²
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻²
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻²
Lactato de sódio	5,0
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴
NaMoO ₄ .2H ₂ O	2,0 x 10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0 x 10 ⁻⁵
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻⁴
Ph	6,5

FONTE: Machado et al., (1995).

3.2.5.6. Meio NFB-Malato

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO NFB-MALATO

Composição	Concentrações
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 ml (10% P/V)
H ₂ SO ₄	(5% V/V)
Ácido Málico	5 g/L
Composição	Concentrações
CaCl ₂ .2H ₂ O	2 ml (1% P/V)
NaCl	1 ml (10% P/V)
FeEDTA	4 ml (1,64% P/V)
Extrato de Levedura	50 mg/L

K ₂ HPO ₄	5 ml (10% P/V)
KOH	4,5 g/L (10% P/V)
Solução de Micronutrientes*	2 ml
Solução de Vitamina*	1 ml
pH	6,5 ou 6,8

FONTE: DÖBEREINER et al., (1999).

*Composição das soluções conforme Döbereiner et al. (1999), para o meio Sólido adicionam-se 15g de Ágar/L.

3.2.4 Espectrometria de Massas MALDI-TOF

Para realização das análises dos perfis proteicos por MALDI-TOF, os isolados dos dois períodos de coletas foram tratados conforme descrito em Souza (2019), utilizando técnica a MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*) usando o Espectrômetro Bruker MALDI AUTOFLEX TOF/TOF e os softwares Bruker flexControl 3.3.108.0 e o Bruker Daltonics flexAnalysis software (3.3.80.0). Sendo cada isolado coberto com 1µL da solução matriz, cuja composição realizada no momento do uso, contém ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma) saturado em solução contendo acetonitrila (50 µL), ácido trifluoracético (2,5 µL) e H₂O (47,5 µL). Após a aplicação da matriz, a placa de MALDI com os isolados em triplicata, foi deixada ao ar, em câmara de segurança microbiológica para secagem e posterior análise.

Após a obtenção dos perfis proteicos, cada um dos perfis das triplicatas foi analisado manualmente no software FlexAnalisys para verificação de possíveis similaridades entre os outros perfis das triplicatas de um mesmo isolado e exclusão de isolados que não possuíssem qualidade de leitura, sendo estabelecido como critério de corte: no mínimo 3 picos e 5.000 de intensidade (m/z) (SOUZA, 2019).

Em seguida os perfis foram comparados contra o banco de espectros de referência, presentes na biblioteca IVD (*In Vitro Diagnostic System, Bruker Daltonics*) integrada, por meio do software MALDI *Biotyper* (versão 3.1) realizando no total três baterias de análises, na tentativa de identificação dos organismos por similaridade dos perfis proteicos.

Utilizando o mesmo programa foi produzido o MSP (*Main Spectrum Projection*) de cada cultura, usando o método padrão de criação de MSP, sendo posteriormente

salvos como um banco de dados da pesquisa, no mesmo software, seguidamente foi produzido um dendrograma com os MSP das culturas das quais foram obtidos espectros com culturas dos dois períodos de coletas (SOUZA, 2019).

Assim, de forma estratégica a espectrometria de massas por MALDI-TOF foi estabelecida como o primeiro método de investigação molecular, permitindo o planejamento dos isolados a serem identificadas por amplificação e sequenciamento do DNA, por meio das informações obtidas das culturas que permitiram criação dos MSP e produção do dendrograma. Deste modo, apenas os isolados que apresentaram espectro e estão presentes no dendrograma (80 isolados), foram selecionados para identificação e sequenciamento do DNA.

3.2.5 Amplificação de DNA por PCR

Com o intuito de dar início a nossa própria biblioteca de espectros ambientais, para a amplificação e posterior sequenciamento do DNA, foi realizado um corte dos isolados, selecionando apenas os 80 isolados que apresentaram espectros, presentes no dendrograma, formado a partir da criação dos MSP na análise de espectrometria de massas por MALDI-TOF.

Para a obtenção do DNA molde os isolados foram submetidos a extração de material genômico por meio do *Kit UltraClean Microbial DNA isolation* (MOBIO). Sendo adicionado ao protocolo de extração uma etapa de aquecimento a 70 °C por 10 minutos, para aumentar o rendimento da extração (seguindo instruções do protocolo).

Outra forma utilizada para obtenção do DNA molde, foi a realização de PCR da colônia, utilizando uma pequena quantidade de massa da colônia (cerca de 1 mm a 2 mm), as colônias foram colhidas com palitos de madeira estéreis e descartáveis, e inoculadas diretamente nos tubos identificados contendo todos os reagentes para PCR. Para os isolados fúngicos foi realizado uma etapa de pré-tratamento para permitir o rompimento das células, no qual uma massa de células foi misturada em 50 µL de água ultra pura e fervidas por 10 min a 95 °C. O material contendo DNA de cada isolado foi utilizado como molde para as reações de PCR, realizadas no departamento de Bioquímica da UFPR.

Para a amplificação de DNA foi utilizado o sistema de reação em cadeia da polimerase (KOCHER e WILSON, 1991). Para a reação de PCR foram utilizados primers universal para 16S: 27F (5'- AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-

RGYTACCTTGTTACGACT 3') (LANE et al., 1991) que permitem à amplificação de quase toda sequência de 1500 pb que compõe o gene 16S, e 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG 3') e 785R (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC 3') (KLINDWORTH et al., 2012), que permitem o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S. Para as regiões do ITS foram utilizados os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). E para o 18S: F566 (5'-CAGCAGCCGCGGTAATTCC-3') e R1200 (5'-CCCGTGTGAGTCAAATTAAGC-3') (HADZIAVDIC et al., 2014).

A amplificação foi realizada em Termociclador *Applied Biosystems* modelo *Veriti*®. As reações foram realizadas seguindo o protocolo da PCR utilizado para reação de amplificação com 20 µL de uma mistura de: 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), 2 µL de amostra de DNA molde e H₂O Milli-Q esterilizada (10,3 µL). As amostras de DNA foram submetidas a um ciclo de 95 °C por 4 minutos, seguidas de 35 ciclos a 95 °C 30 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 90 minutos. Com extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Para todas as reações foram realizados controles negativos com a substituição do DNA amostral por água. A visualização do DNA foi realizada por meio de eletroforese. 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 há 80 °C por 15 minutos.

3.2.6 Eletroforese de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose (1%) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) horizontal conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989) com modificações. Para visualização da amostra de DNA, o gel foi tratado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.7 Reação de Sequenciamento de DNA

Para sequenciamento do DNA foi utilizado o método de terminação de cadeia por meio de didesoxirribonucleotídeos (dNTPs) em um sequenciador de DNA Automático (ABI XL3500). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando

o sistema *Bigdye terminator mix* (*Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA*), onde são utilizados quatro ddNTPs com fluorescência, apresentando a função de terminadores de cadeia, seguidos por eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção a Laser (HUERGO, 2006).

As amostras de DNA amplificadas foram sequenciadas no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná em Curitiba.

3.2.8 Análise das sequências

As sequências de DNA dos isolados que apresentaram amplificação e sequenciamento com qualidade a partir dos genes mencionados foram analisadas e editadas através do software BioEdit (HALL, 1999) e MEGA 7 (KUMAR et al., 2016) no qual foi possível checar a qualidade das sequências manualmente e remover regiões com sobreposições e ambiguidades.

Posteriormente, as sequências obtidas foram confrontadas utilizando a ferramenta BLASTn, contra o banco de dados padrão *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (ALTSCHUL et al., 1990) e nos bancos de dados curados *16S ribosomal RNA sequences* (Bacteria/Archaea) (JOHNSON et al., 2008) e *Internal transcribed spacer region (ITS) from fungi type and reference material* (SCHOCH et al., 2014) do (NCBI), por fim contra a ferramenta *Classifier* do banco de dados *Ribosomal Database Project* (RDP) (WANG et al., 2007) para identificar a similaridade taxonômica, utilizando a ferramenta com corte *bootstrap* a 80%.

3.2.9 Teste suscetibilidade antimicrobiana

3.2.9.1 Teste de suscetibilidade aos antibióticos

Para o teste de suscetibilidade aos antibióticos foram utilizadas as cepas bacterianas utilizadas como padrão em testes de sensibilidade antimicrobiana, a cepa *Escherichia coli* NCM 3722 e a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Como metodologia foi utilizado o ensaio *in vitro* de difusão em disco (BAUER et al. 1966). No qual, discos de papel foram embebidos com 10 µL do antibiótico a ser testado em diferentes concentrações, para encontrar a concentração ideal de

antibiótico inibitória contra as duas cepas testadas. Como controle positivo foram utilizadas diferentes concentrações do antibiótico Canamicina (100 mg/mL, 10 mg/mL, 1 mg/mL e 0,1 mg/L). E da mesma forma o antibiótico Tetraciclina (10 mg/mL, 1 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL).

Para isso, colônias isoladas de *E. coli* e *S. aureus* foram cultivadas em meio caldo Luria Bertani a 37 °C por 24 horas. Após este período foi realizada uma diluição 1:5, na qual uma alíquota de 2 mL foi diluída em LB para volume final de 10 mL, ajustando a densidade ótica (D.O) das suspensões (D.O 600nm=0,5). Uma alíquota de 300 µL da dessa diluição foi distribuída uniformemente na superfície do meio sólido em placas de Petri de 14,5 cm para formação do tapete de células sob o Ágar, sendo utilizado para *E. coli* o meio de cultivo LA e para *S. aureus* o meio Tryptona Soya. Após 24h de incubação a 37 °C em estufa bacteriológica foram observados a formação de halos.

3.2.9.2 Teste de suscetibilidade aos metabólitos secundários de fungos e bactérias

3.2.9.2.1 Microrganismos

Para os ensaios de atividade antimicrobiana dos extratos foram utilizadas duas cepas bacterianas como padrão em testes de sensibilidade antimicrobiana, como bactéria Gram-negativa foi utilizada a cepa *Escherichia coli* NCM 3722 e como bactéria Gram-positiva a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.2.9.2.2 Extração de metabólitos secundários

Dentre as 80 culturas isoladas, presentes no dendrograma, foram selecionados um total de 50 isolados para realizar a extração dos metabólitos secundários. Dentre os 50 selecionados, 32 deles possuem identificação e restante dos isolados (n=18), permanecem sem identificação, no entanto, foram selecionados por apresentarem morfologia e características distintas, como por exemplo, coloração e produção de exsudatos. A extração dos metabólitos foi realizada conforme SARMIENTO-VIZCAÍNO, et al. (2017).

As placas contendo os microrganismos isolados foram cultivadas conforme mencionado anteriormente, para extração dos metabólitos secundários. Após o crescimento microbiano, as placas foram divididas em quatro partes iguais e com o

auxílio de uma espátula esterilizada, foi selecionado 1/4 do meio com contendo o microrganismo, passando-o para um tubo *falcon* esterilizado, com auxílio de uma pinça o meio foi triturado para formação de pedaços menores.

Logo após foi adicionado aos tubos *falcon* 3 ml de Ácido Fórmico (1%) diluído em acetato de etila e deixados em descanso por 45 minutos em temperatura ambiente.

Diluição de 1% de ácido fórmico em acetato de etila:

- Ácido fórmico P.A (85%)
- Acetato de etila P.A (99,5%)

Fórmula:

$$C1.V1 = C2.V2$$

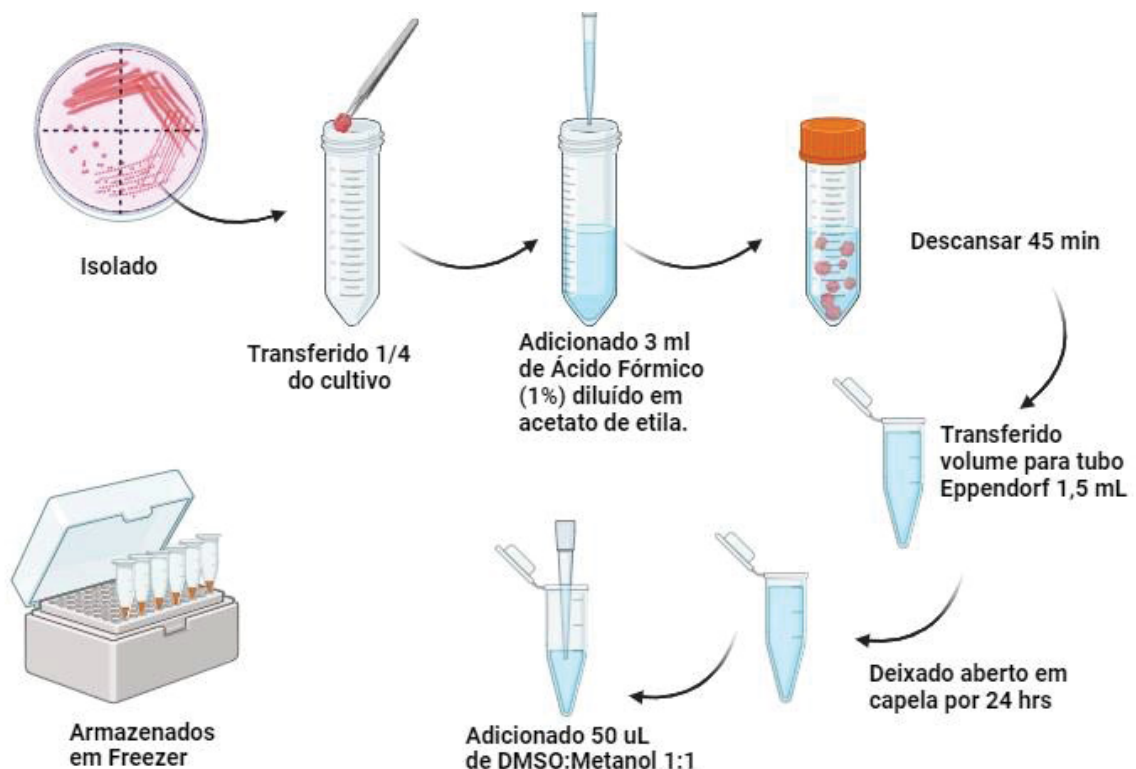
$$85\%.V1 = 1\%.500\text{ ml}$$

$$V1 = 5,88\text{ ml ácido fórmico}$$

$$500\text{ ml} - 5,88 = 494,12\text{ ml de acetato de etila}$$

Após o tempo de repouso, o líquido foi separado com micropipeta, em *eppendorfs* 1,5 ml que foram deixados em capelas de exaustão durante 24 horas para evaporação do solvente e separação do extrato. Em seguida foram adicionados 50 µL da solução de DMSO e metanol na proporção 1:1. Como é possível observar na FIGURA 13.

FIGURA 13 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS



FONTE: AUTORA (2023).

Posteriormente os extratos obtidos foram armazenados em Freezer. Os compostos extraídos foram utilizados em ensaios de atividade antimicrobiana.

3.2.9.2.3 Ensaio antimicrobiano

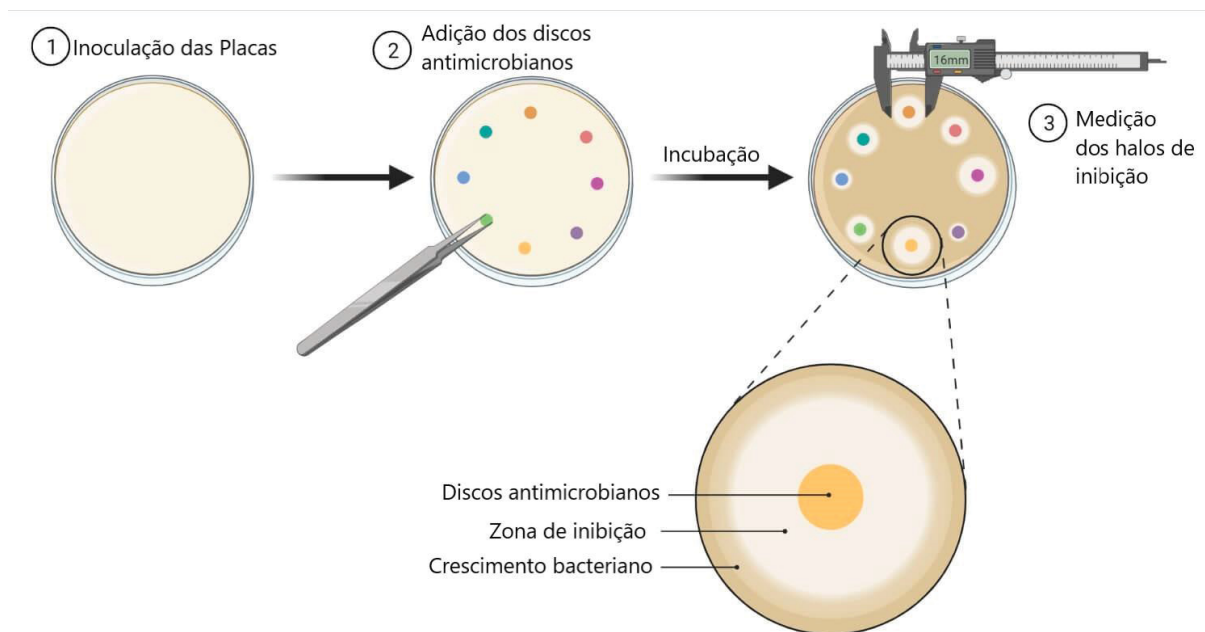
Para a verificação da atividade antimicrobiana foi realizado um ensaio *in vitro* de difusão em disco (BAUER et al. 1966). Este método consiste na difusão de discos de filtro de papel embebidos com o agente antimicrobiano a ser testado na superfície de ágar com bactéria inoculada, para a identificação de halos de inibição. Para isso, colônias isoladas de *E. coli* e *S. aureus* foram cultivadas em meio caldo Luria Bertani a 37 °C por 24 horas.

Após este período foi realizada uma diluição 1:5, na qual uma alíquota de 2 mL foi diluída em LB para volume final de 10mL, ajustando a densidade ótica (D.O) das suspensões (D.O 600nm=0,6). Uma alíquota de 300µL da dessa diluição foi distribuída uniformemente na superfície do meio sólido em placas de Petri de 14,5 cm para formação do tapete de células sob o Ágar, sendo utilizado para *E. coli* o meio de

cultivo LA e para *S. aureus* o meio Tryptona Soya. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Discos de filtro de papel 6 mm de diâmetro, foram preparados e embebidos com 10 µL dos extratos obtidos, como controle positivo foi utilizado 10 µL de Tetraciclina 1 mg/ml e como controle negativo 10 µL da solução DMSO e metanol na proporção 1:1. Os discos foram dispostos nas placas com as bactérias inoculadas e incubadas na estufa a 37°C por 24 horas conforme FIGURA 14.

FIGURA 14 – METODOLOGIA DE DIFUSÃO EM DISCO



LEGENDA: Metodologia difusão em disco proposta por Bauer et al. (1966).

FONTE: Adaptado de Microbenotes (2022).

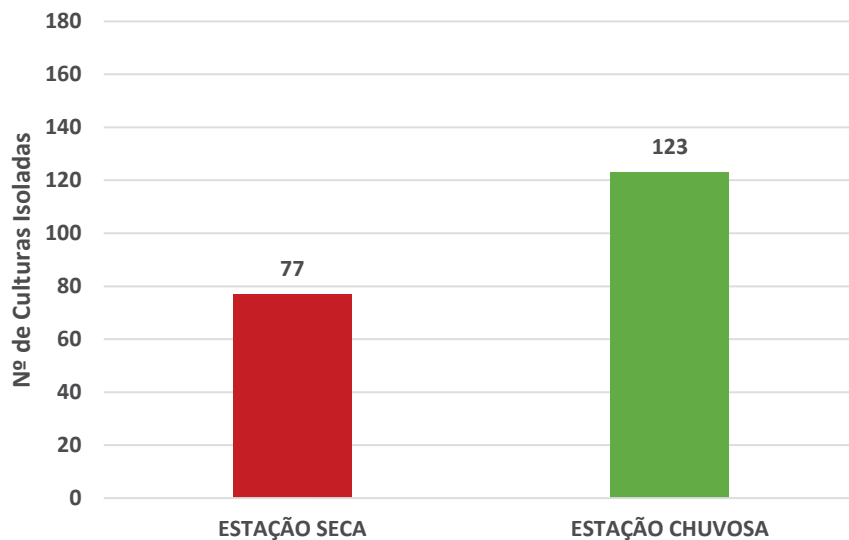
A suscetibilidade foi observada na formação de halos de inibição e esse medidos com auxílio de um paquímetro.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Cultivo dos isolados

Foram contabilizados 200 isolados cultivados em todos os meios de cultura utilizados, presentes nos estoques de glicerol 50% da coleção de bioaerossóis do Laboratório de Microbiologia Molecular do Setor Litoral da UFPR. Sendo 77 coletados na estação seca e 123 coletados na estação chuvosa conforme GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 – TOTAL DE ISOLADOS OBTIDOS POR ESTAÇÃO NO ATTO



FONTE: AUTORA (2023).

LEGENDA: Total de isolados obtidos durante coletas nas estações seca (2018) e chuvosa (2019) na estação científica ATTO.

Após a primeira coleta das amostras em 2018, observou-se por meio de análises do DNA total das amostras realizadas por Souza et al., (2019) em de estudos de metagenômica, a presença de gêneros bacterianos como *Bacillus*, *Streptomyces* (presentes nos solos), *Azospirillum* (presentes na rizosfera) e *Oceanobacillus* (presentes na água), demonstrando que atmosfera pode ser o local ideal de interação entre bactérias de fontes de água, solo e plantas.

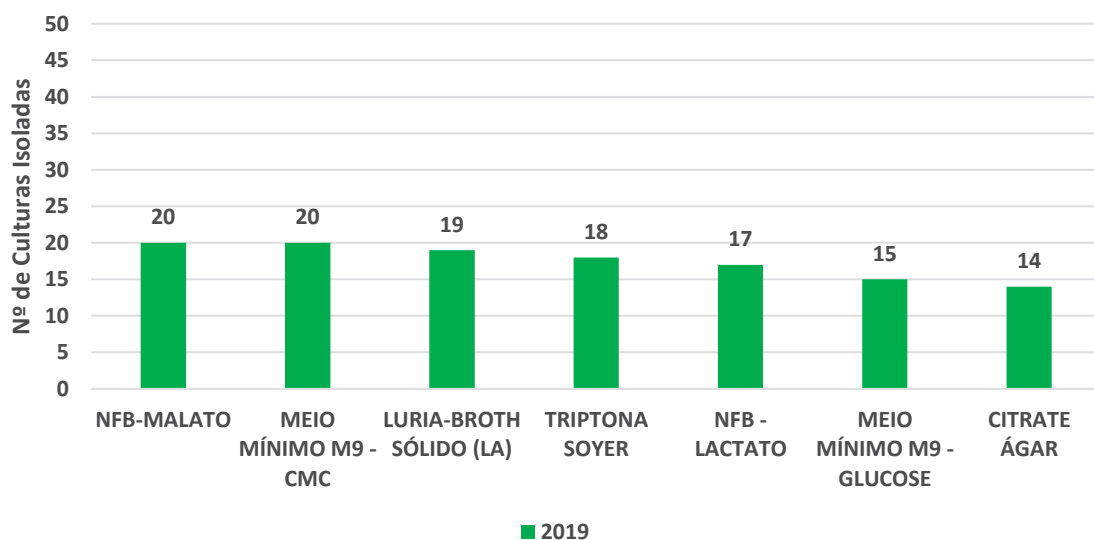
O que parte desses gêneros têm em comum, como *Bacillus*, *Streptomyces* e *Azospirillum* são importantes gêneros estudados quanto a sua capacidade de exercer atividades com potenciais biotecnológicos, como a produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar celulose, a produção de metabólitos secundários, úteis para

exercer controle microbiano, bem como a capacidade de fixar biologicamente nitrogênio. Por esse motivo, para as amostras coletadas em 2019 foram adicionados mais três meios de cultivo, sendo o meio Mínimo M9 com adição celulose cristalina; NFB Lactato e NFB Malato.

O Meio mínimo M9 CMC contendo como fonte de carbono a celulose cristalina, é um meio seletivo, utilizado para triagem de microrganismos degradadores de celulose, embora seja preciso mencionar, que por ser um meio mínimo não permite o crescimento de bactérias que precisam de elementos específicos para crescer (BONNET et al., 2020). Os meios NFB são utilizados para identificar bactérias diazotróficas (bactérias que usam N₂ como fonte de nitrogênio para seu crescimento, ou seja, bactérias fixadoras de nitrogênio) (DÖBEREINER et al., 1995).

Entre os sete meios de cultura utilizados para cultivo das amostras coletadas em 2019, os meios com maior número isolados presentes nos estoques foram: meios M9 com CMC e NFB Malato, ambos com 20 colônias isoladas, em seguida o meio LA como 19 colônias, o meio *Tryptona Soya* com 18 colônias, o meio NFB-Lactato com 17 colônias, o meio M9 glucose com 15 colônias e por fim o meio Citrate Ágar com 14 colônias isoladas, conforme demonstrado no GRÁFICO 2.

GRÁFICO 2 – NÚMERO DE CULTURAS OBTIDAS POR MEIO DE CULTURA NA COLETA DA ESTAÇÃO CHUVOSA EM 2019



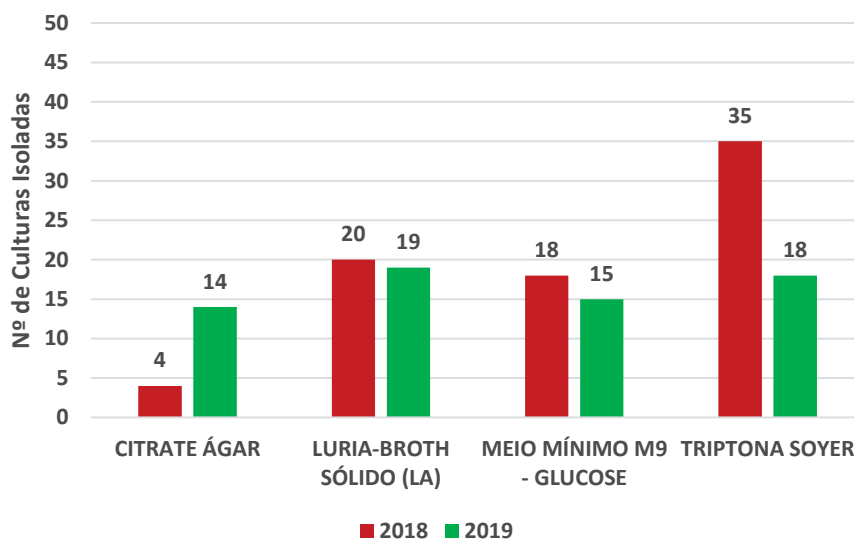
FONTE: AUTORA (2023).

LEGENDA: Número total de isolados obtidos por meio de cultura, coletados na estação chuvosa (2019) no ATTO.

O número de isolados obtidos nos meios de cultura *Tryptona Soya*; LA; Citrate Ágar e meio Mínimo M9, contendo glucose como fonte de carbono nos períodos de

coleta 2018 e 2019, apresentaram pouca diferença entre as estações de coleta, com exceção do meio *Tryptona Soya*, conforme é possível observar no GRÁFICO 3.

GRÁFICO 3 – NÚMERO DE CULTURAS OBTIDAS POR MEIO DE CULTURA SEMELHANTES NOS PERÍODOS DE COLETA 2018 E 2019



FONTE: AUTORA (2023).

LEGENDA: Número total de isolados obtidos em meios de cultura semelhantes, em estações distintas 2018 (estação seca) e 2019 (estação chuvosa).

No meio LA ocorreu a variação de uma colônia entre as duas coletas, sendo 2018 apresentado 20 colônias isoladas e em 2019 foram obtidas 19 culturas isoladas. No meio Citrato Ágar, no ano de 2018, o número de culturas obtidas foi de 5 isolados, porém uma delas não foi possível sua reativação para estudos, enquanto em 2019, foram obtidos 14 isolados. Esse meio é comumente utilizado para identificar microrganismos que têm no citrato a sua principal fonte de energia, bem como para realizar a diferenciação de bacilos gram-negativos em um ambiente laboratorial. Para o meio Mínimo M9, contendo glucose como fonte de carbono, a diversidade de colônias obtidas foi de 18 colônias para 2018 e 15 para 2019. O meio mínimo M9 é um meio seletivo usado para o cultivo de bactérias. Com base na formulação de sais mínimos M9, é possível sua suplementação com uma variedade de aminoácidos e fontes de carbono (MILLER et al., 1972).

Embora seja preciso mencionar, que apenas uma pequena fração de microrganismos podem ser cultivadas pelas técnicas contemporâneas, a maioria deles não é cultivável em condições laboratoriais (OTLEWSKA et al., 2014; NAKAMURA et al., 2016; HOFER, 2018; HAHN et al., 2019; SCHMIDT, 2019).

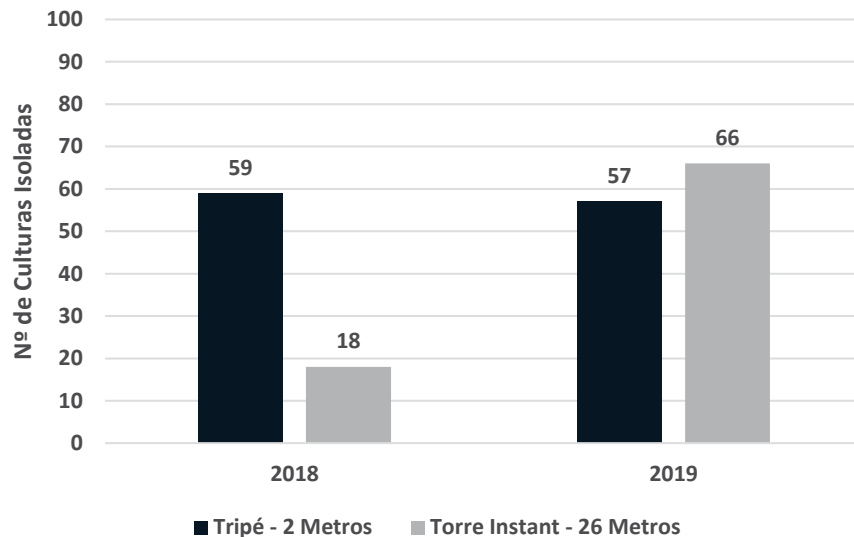
Segundo um estudo realizado por Hahn et al., (2019), ao levarmos em consideração a ampla gama de microrganismos com diferentes fisiologias e necessidades incomuns, encontrar um meio de cultivo universal, que atenda às demandas de todos os microrganismos existentes ainda é um desafio.

Ainda segundo Hahn et al. (2019) a disponibilidade microbiana limitada pelo cultivo pode decorrer de diferentes fatores, como a baixa abundância no número de células ou morte celular (células não viáveis), a inadequação do método de cultivo empregado, na falta de um meio microbiológico altamente específico ou pela falta de condições específicas de cultivo (como temperatura e umidade), uma vez que, podem diferir de táxon para táxon ou mesmo de célula para célula, cada componente se torna crucial e um único detalhe pode acabar impedindo o crescimento de um determinado táxon.

Quanto ao número total de culturas presentes no inventário, obtidas a partir de diferentes alturas acima do solo, no ano de 2018, dos isolados obtidos das amostras coletadas a 2 metros do solo, permanecem nos estoques 59 isolados e 18 isolados das amostras coletadas a 26 metros de altura. No ano de 2019 foram selecionadas, para obtenção de culturas puras, 57 isolados das amostras coletadas a 2 metros de altura e 66 isolados a 26 metros de altura conforme GRÁFICO 4.

No entanto, se faz necessário mencionar que no ano de 2019 foram adicionados mais três meios de cultura (NFB Lactato, NFB Malato e meio Mínimo M9 CMC), para obtenção de culturas puras como mencionado anteriormente, essa adição contribuiu para um acréscimo no número de culturas isoladas no ano de 2019 conforme GRÁFICO 2.

GRÁFICO 4 – NÚMERO DE CULTURAS OBTIDAS POR ALTURA NAS COLETAS DA ESTAÇÃO SECA E CHUVOSA



Fonte: Autor (2023).

LEGENDA: Total de isolados coletados por altura, a dois metros do solo e a 26 metros de altura, nos períodos de coletas 2018 (estação seca) e 2019 (estação chuvosa).

No entanto, como mencionado anteriormente, diferentes questões podem inibir o crescimento de microrganismos em ambiente laboratorial e por esse mesmo motivo, o método de cultivo não retrata com eficiência a composição da diversidade microbiológica de um determinado ecossistema, pois apenas uma pequena parte é passível de ser cultivado (HAHN et al., 2019).

Em ambas as coletas, as amostras (os filtros de policarbonato) utilizadas como controle negativo, não apresentaram desenvolvimento de culturas durante o cultivo, indicando que não houve contaminação no processo de obtenção das amostras. O restante das amostras cultivadas para obtenção de culturas puras, foram cultivadas realizando uma triagem prévia dos isolados, selecionando os microrganismos com morfologia e características distintas, para posterior depósito nos estoques em glicerol 50%, desse modo não há como aferir com exatidão a composição do microbioma (comunidade de microrganismos que partilha um mesmo ambiente) por técnicas de cultivo.

Segundo Souza (2019), um dos fatores limitantes no que diz ao cultivo de bioaerossóis, pode ser a passagem constante e prolongada de ar pelo amostrador,

que pode acabar dificultando o cultivo de culturas após a coleta. Pepper e Gerbar (2015, p. 95) descrevem que “a atmosfera é um clima inóspito para microrganismos principalmente por causa do estresse de dessecação” (processo de secagem de um organismo vivo ou morto), para esses autores a capacidade de sobrevivência microbiana no ar depende de inúmeros fatores ambientais, sendo as mais importantes a umidade relativa e a temperatura, entre outras como a radiação solar, íons específicos, o teor de oxigênio, poluentes e fatores associados ao ar.

No entanto, alguns microrganismos, desenvolveram habilidades específicas que garantem maior resistência aos estresses ambientais, esses microrganismos, como bactérias e fungos, formadores de esporos e protozoários formadores de cistos podem vir a sobreviver indefinidamente (PEPPER; GERBAR, 2015).

De acordo com Fröhlich-Nowoisky et al. (2016), acredita-se que o estresse atmosférico induzido nos microrganismos enquanto estão em suspensão no ar, induzem sua atividade e vitalidade, bem como a capacidade de colonizar novos habitats e sobreviver, podendo esse estresse ser considerado uma força evolutiva que expõe os bioaerossóis transportados pelo ar à pressão de seleção, afetando assim a dispersão e a evolução dos microrganismos.

Apesar da escolha dos meios de cultivo das coletas iniciadas em 2018, ter ocorrido preferencialmente para o cultivo de bactérias, observou-se uma alta plasticidade de adaptação de crescimento fúngico nos meios de cultivos utilizados, embora tenha sido aplicado o antifúngico cicloheximida 0.05% (p/v), o que indica o crescimento de fungos resistentes à cicloheximida (WHIFFEN, 1948; 1950).

Embora o antibiótico possua propriedades antifúngicas significativas, de ação rápida e baixo custo, com um amplo espectro de ação frente a diferentes fungos (atuando inibindo o funcionamento dos ribossomos 80S durante a síntese de proteínas) e seja frequentemente usado para o cultivo fúngico, alguns fungos podem apresentar resistência a esse composto (PIZZOL, 2020; ABDILLAH et al., 2021; SYUHADA et al., 2022).

Syuhada, et al. (2022) observaram uma forte e generalizada resistência à cicloheximida em táxons de algas eucarióticas semelhantes a *Stichococcus*. Enquanto Abdillah et al. (2021) observaram ao testar o macrolídeo rapamicina em combinação com a cicloheximida para desenvolver um meio de cultura seletivo para espécies de *Malassezia* (leveduras), que a suplementação com rapamicina e cicloheximida no meio FastFung inibiu efetivamente o crescimento de leveduras não

Malassezia. SARMIENTO-VIZCAÍNO, et al. (2017) utilizaram o antifúngico cicloheximida para o isolamento de cepas de actinobactérias bioativas para a produção de antibióticos, na qual a cicloheximida inibiu o crescimento fúngico.

3.3.2 Análise em MALDI-TOF e *BIOTYPER*

A técnica analítica MALDI-TOF é um método que utiliza ionização e separação de partículas de acordo com sua razão massa-carga, o espectro resultante com valores de massa-carga, obtido da análise é confrontado a um banco de dados de espectros de organismos conhecidos, permitindo a identificação rápida de microrganismos (RYCHERT, 2019). Devido ao seu rápido tempo de resposta, tornou-se popular na identificação de microrganismos em laboratórios de diagnóstico clínico.

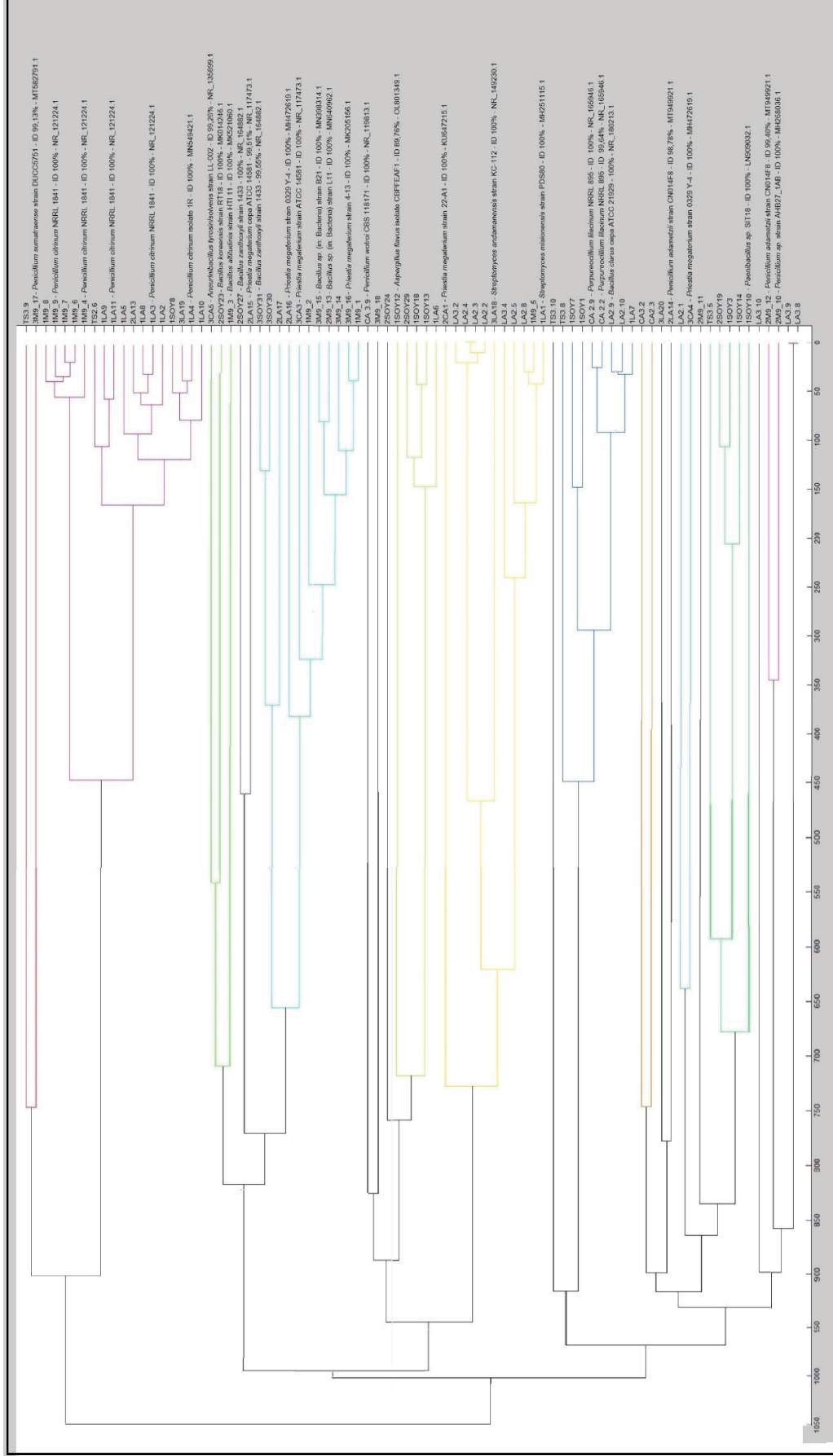
Assim, com o intuito de dar início a nossa própria biblioteca de espectros ambientais, de forma estratégica a espectrometria de massas por MALDI-TOF foi estabelecida como o primeiro método de investigação molecular.

Após a obtenção dos espectros resultantes das culturas submetidas ao método em triplicata, foram realizadas três baterias de análise, dos quais foram gerados dendrogramas. Das 200 culturas isoladas entre os dois anos de coletas, após as 3 baterias de análise foram obtidos espectros proteicos de 80 isolados, sendo 57 pertencentes às coletadas realizadas em 2018 e 23 em 2019, variando entre 2 e 9 espectros por UFC, o restante dos isolados não obtiveram espectros no decorrer das análises. Os espectros obtidos foram utilizados para a criação do MSP (padrão) dessas culturas e com esses foi elaborado um dendrograma de MSP que pode ser observado na FIGURA 15. Os MSP criados foram salvos no banco de dados do software MALDI *Biotyper*.

Os perfis proteicos obtidos, foram submetidos à análise de similaridade frente os perfis de referência do banco de MSP do *Biotyper*, no entanto, nenhum perfil apresentou similaridade taxonômica com os MSP de referência do banco de dados *Biotyper*.

Em um estudo realizado por Carbonnelle et al. (2007) os autores relatam que as condições e o tempo de cultivo não afetaram a identificação microbiana por MALDI-TOF. Drissner et al. (2017) relatam que em grande parte os espectros de referência MALDI-TOF, bem como os instrumentos de análise, são fortemente focados em aplicações médicas.

FIGURA 15 – MSP DENDROGRAMA DAS CULTURAS COLETADAS EM 2018 E 2019



FONTE: Software Biotyper (2023).

LEGENDA: Dendrograma obtido com MSP de 80 das 200 culturas isoladas nos dois períodos amostrados, sendo 57 pertencentes a coleta 2018 e 23 a coleta 2019. O restante dos isolados não obtiveram espectros no decorrer das análises. O gênero e espécie descritos após o código dos isolados, dizem respeito aos isolados sequenciados a partir de genes específicos e posteriormente submetidos ao programa BLAST do NCBI.

Carbonnelle et al. (2012) e Rychert (2019) atribuem essa falha à possibilidade de o organismo ainda não ter sido incluído nos bancos de dados anteriores, e não ao erro metodológico, uma vez que, para organismos ausentes no banco de dados, os sistemas estão geralmente programados para produzir o resultado de “sem identificação” em vez de uma identificação incorreta.

Para Mancini et al. (2013) embora apresentem diferenças, as plataformas de análises são igualmente precisas, específicas e reprodutíveis. No entanto, segundo Rychert (2019) a garantia de uma identificação confiável utilizando MALDI-TOF, depende em grande parte do banco de dados que contém os espectros de organismos conhecidos, bem como da ausência um repositório público abrangente de espectros de referência MALDI-TOF, dado que grande parte dessas bibliotecas são ferramentas para fins comerciais (DRISSNER et al., 2017).

De acordo com Drissner et al. (2017) nos casos em que a análise por MALDI-TOF não aponta a identidade de um organismo, o sequenciamento clássico de Sanger ou ensaios baseados em DNA podem ser utilizados a fim de se obter a identificação. A identificação com base em tal ensaio, permitirá a geração de novos espectros de referência, que possibilitará identificar esta espécie no futuro pela técnica de MALDI-TOF, uma vez que, uma das vantagens oferecidas por essas plataformas de análises de espectros proteicos, é a possibilidade de o usuário adicionar organismos ao banco de dados para uso em pesquisa, tornando possível a criação de uma biblioteca de espectros particular (DRISSNER et al., 2017; RYCHERT, 2019).

Desse modo, como nenhum dos perfis apresentou similaridade taxonômica com os MSP de referência do banco de dados *Biotyper*. Foram selecionados para serem identificados por amplificação e sequenciamento do DNA, todos os isolados que apresentaram espectros com qualidade (80 isolados), e estão presentes no dendrograma (FIGURA 15), os MSP criados foram salvos no banco de dados do software MALDI *Biotyper*, dando início a uma biblioteca particular de culturas ambientais.

Neste contexto, na FIGURA 15 é possível observar os isolados identificados até o momento por técnicas baseadas em sequenciamento do DNA e posteriormente submetidos ao programa BLAST do NCBI para observar a similaridade genotípica das sequências dos isolados (descritos com mais detalhes no tópico 3.3.3).

Na FIGURA 15, a análise dos agrupamentos de cluster no dendrograma de MALDI-TOF, que é uma análise proteômica que consiste na separação e identificação

dos perfis proteicos, realizada a partir do agrupamento dos perfis proteicos em clusters que apresentam maiores semelhanças entre si.

Entre os três filos *Ascomycota*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* identificados através de análises de sequenciamento do DNA, no primeiro grupo de cluster na parte superior da imagem ao nível de distância alta (900), separando-se posteriormente em outros dois clusters menores, é possível observar um pareamento entre espécies *Penicillium citrinum* NRRL 1841, *Penicillium citrinum* isolate 1R e *Penicillium sumatraense* strain DUCC5751 pertencentes ao filo as *Ascomycota*.

No cluster abaixo ao nível de distância alta (800), subdivido em clusters três menores (nas cores verde, azul-marinho e azul-claro) é possível notar um grupo formado por isolados pertencentes ao filo *Firmicutes*, com pareamento entre as espécies *Aneurinibacillus tyrosinisolvens* strain LL-002, *Bacillus koreensis* strain RT18, *Bacillus altitudinis* strain HTI 11, *Bacillus zanthoxyli* strain 1433, *Priestia megaterium* cepa ATCC 14581, *Priestia megaterium* strain 0329 Y-4, *Bacillus* sp. (in: *Bacteria*) strain L11, *Priestia megaterium* strain 4-13 e *Bacillus* sp. (in: *Bacteria*) strain B21, esse filo é constituído em sua maioria por bactérias que possuem uma parede celular Gram-positiva.

As espécies pertencentes ao terceiro filo, podem ser observadas no cluster posterior subdividido em cluster menores, com o nível de distância de entre 750 e 700 correspondentes a cor amarela, estão reunidas duas bactérias pertencentes ao filo *Actinobacteria*, sendo elas as espécies *Streptomyces andamanensis* strain KC-112 e *Streptomyces andamanensis* strain KC-112, as espécies pertencentes a esse filo geralmente são gram-positivas, constituídas geralmente por micélios, podendo apresentar ramificações filamentosas.

Os isolados sem identificação distribuídos nos diferentes clusters, até o momento não apresentaram amplificação de material genético.

A técnica analítica de espectrometria de massas aliada a técnicas baseadas em sequenciamento do DNA, permitirá a futuras análises ambientais o confronto com o nosso banco de dados criado com os organismos identificados, permitindo com baixo volume de amostra a identificação rápida de microrganismos.

3.3.3 Taxonomia Molecular de Fungos e Bactérias

Com o intuito de dar início à nossa própria biblioteca de espectros ambientais, a espectrometria de massas por MALDI-TOF foi estabelecida como uma linha de corte e como primeiro método de investigação molecular, permitindo o planejamento dos isolados a serem identificados por amplificação e sequenciamento do DNA, a partir dos isolados presentes no dendrograma.

Desse modo, entre as 200 culturas isoladas, entre os períodos amostrados, foi delimitado como prioridade o sequenciamento todos os 80 isolados que apresentaram espectros, presentes no dendrograma, formado a partir da criação dos MSP na análise de espectrometria de massas por MALDI-TOF, para sequenciamento.

Dentre os isolados presentes no dendrograma do MALDI-TOF, foram identificados por sequenciamento do gene 16S rDNA; 18S e Regiões do ITS, 30 isolados entre os dois períodos amostrados. Apenas os isolados presentes no dendrograma que ainda não foram sequenciados e identificados, foram enviados em parceria com à Rede de Coleções Microbiológicas do Paraná (CMRP), com laboratório sede instalado no Departamento de Patologia Básica da UFPR para posterior identificação. Entre os 49 isolados a serem identificados, foram enviados um total de 40 isolados, os outros 09 não obtiveram crescimento no período de envio do material microbiológico.

Além dos 30 isolados identificados presentes no Dendrograma de MALDI-TOF, foram identificadas mais duas culturas isoladas das coletas de bioaerossóis no Sítio ATTO que estão ausentes no Dendrograma (3SOY35 e 1SOY15), esses dois isolados não apresentaram espectros proteicos com qualidade na análise de MALDI-TOF (SOUZA, 2019). Totalizando 32 culturas isoladas identificadas até o presente momento. Desses 32 isolados, 14 foram descritos anteriormente por Souza (2019), e 28 foram coletados em 2018 e 4 em 2019, sendo 19 bactérias e 13 fungos, com sequências que variam entre 279 e 1404 pares de bases (pb).

O número total de sequências obtidas de isolados coletados em 2018 e 2019 no sítio ATTO, verificadas na ferramenta BLAST (NCBI), podem ser observadas na TABELA 5. De acordo com Drissner et al. (2017) os métodos de identificação baseados em DNA, contam com repositórios de sequências de DNA públicos e muitas ferramentas de análise de acesso aberto ou para download, incluindo sequências curadas.

TABELA 5 – NÚMERO TOTAL DE SEQUÊNCIAS OBTIDAS DE ISOLADOS COLETADOS EM 2018 E 2019 NO SÍTIO ATTO, VERIFICADAS NA FERRAMENTA BLAST (NCBI)

Amostra	Coleta	Total pb	Reino	Descrição (BLAST)
1LA1	2018	722	Bacteria	<i>Streptomyces misionensis strain PDS80</i>
1LA3	2018	299	Fungi	<i>Penicillium citrinum NRRL 1841</i>
1LA4	2018	511	Fungi	<i>Penicillium citrinum isolate 1R</i>
1LA11	2018	431	Fungi	<i>Penicillium citrinum NRRL 1841</i>
2LA14	2018	576	Fungi	<i>Penicillium adametzii strain CN014F8</i>
2LA15	2018	405	Bacteria	<i>Priestia megaterium cepa ATCC 14581</i>
2LA16	2018	678	Bacteria	<i>Priestia megaterium strain 0329 Y-4</i>
3LA18	2019	903	Bacteria	<i>Streptomyces andamanensis strain KC-112</i>
LA2.9	2018	449	Bacteria	<i>Bacillus clarus cepa ATCC 21929</i>
2CA1	2018	1372	Bacteria	<i>Priestia megaterium strain 22-A1</i>
3CA3	2018	500	Bacteria	<i>Priestia megaterium strain ATCC 14581</i>
3CA4	2018	1404	Bacteria	<i>Priestia megaterium strain 0329 Y-4</i>
3CA5	2018	807	Bacteria	<i>Aneurinibacillus tyrosinisolvans strain LL-002</i>
CA2.2	2019	281	Fungi	<i>Purpureocillium lilacinum NRRL 895</i>
CA2.9	2019	301	Fungi	<i>Purpureocillium lilacinum NRRL 895</i>
CA3.9	2019	279	Fungi	<i>Penicillium wotroi CBS 118171</i>
1M9_3	2018	1279	Bacteria	<i>Bacillus altitudinis strain HTI 11</i>
1M9_4	2018	529	Fungi	<i>Penicillium citrinum NRRL 1841</i>
1M9_9	2018	525	Fungi	<i>Penicillium citrinum NRRL 1841</i>
2M9_10	2018	521	Fungi	<i>Penicillium sp. strain AHB27_1AB</i>
2M9_12	2018	529	Fungi	<i>Penicillium adametzii strain CN014F8</i>
2M9_13	2018	1398	Bacteria	<i>Bacillus sp. (in: Bacteria) strain L11</i>
3M9_15	2018	1288	Bacteria	<i>Bacillus sp. (in: Bacteria) strain B21</i>
3M9_16	2018	1124	Bacteria	<i>Priestia megaterium strain 4-13</i>
3M9_17	2018	573	Fungi	<i>Penicillium sumatraense strain DUCC5751</i>
1SOY10	2018	680	Bacteria	<i>Paenibacillus sp. SIT18</i>
1SOY12	2018	300	Fungi	<i>Aspergillus flavus isolate CBPF EAF1</i>
1SOY15	2018	1371	Bacteria	<i>Staphylococcus sp. strain R306</i>
2SOY23	2018	1253	Bacteria	<i>Bacillus koreensis strain RT18</i>
2SOY27	2018	444	Bacteria	<i>Bacillus zanthoxyli strain 1433</i>
3SOY31	2018	449	Bacteria	<i>Bacillus zanthoxyli strain 1433</i>
3SOY35	2018	1165	Bacteria	<i>Gordonia hongkongensis strain 5-5 16S</i>

Uma dessas ferramentas é o programa BLAST do NCBI, ferramenta que tem sido útil para encontrar regiões de similaridade entre sequências biológicas, comparando sequências de nucleotídeos com sequências depositadas no banco de dados Genbank e calculando a significância estatística das correspondências, apresentando pontuação máxima do alinhamento local entre sequências, sendo muito

utilizado para compreender relações funcionais e evolutivas entre sequências estudadas (BLAST, 2022).

É possível observar na TABELA 6 a similaridade genotípica das sequências dos isolados bacterianos obtidas através do sequenciamento do gene 16S rRNA, comparadas as sequências do banco de dados Genbank pela ferramenta BLAST. Os resultados obtidos demonstraram que quase todas as sequências apresentaram 100% de similaridade taxonômica com as espécies depositadas no banco de dados, com exceção das sequências dos isolados LA2.9, 3CA5, 2SOY27 e 2LA15.

TABELA 6 – SIMILARIDADE GENOTÍPICA DAS SEQUÊNCIAS DOS ISOLADOS COM SEQUÊNCIAS DO BANCOS DE DADOS GENBANK PELA FERRAMENTA BLAST DO NCBI

Isolados	NCBI	Descrição (BLAST)	Query Cover	ID %	Referência
1LA1	MH251115.1	<i>Streptomyces misionensis</i> strain PDS80	100%	100%	Wen, C.C; Liu, C. 2018
2LA16	MH472619.1	<i>Priestia megaterium</i> strain 0329 Y-4	100%	100%	Chen, Y. 2018
LA2.9	NR_180213.1	<i>Bacillus clarus</i> cepa ATCC 21929	99%	100%	Mendez, A. M. 2022
3LA18	NR_149230.1	<i>Streptomyces andamanensis</i> strain KC-112	100%	100%	Sripreechak, P. et al., 2016
1LA3	NR_121224.1	<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 1841	100%	100%	Schoch, C. L. 2014
1LA4	MN549421.1	<i>Penicillium citrinum</i> isolate 1R	100%	100%	Kithaku, E. 2019
1LA11	NR_121224.1	<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 1841	100%	100%	Schoch, C. L. 2014
2LA14	MT949921.1	<i>Penicillium adametzii</i> strain CN014F8	100%	98,78%	Visagie, C. et al., 2020
2LA15	NR_117473.1	<i>Priestia megaterium</i> cepa ATCC 14581	99%	99,51%	Beesley, C. A, Y. et al., 2010
2CA1	KU647215.1	<i>Priestia megaterium</i> strain 22-A1	100%	100%	Zheng, B. et al., 2016
3CA3	NR_117473.1	<i>Priestia megaterium</i> strain ATCC 14581	100%	100%	Beesley, C. A. et al., 2014
3CA4	MH472619.1	<i>Priestia megaterium</i> strain 0329 Y-4	100%	100%	Chen, Y. 2018
3CA5	NR_135899.1	<i>Aneurinibacillus tyrosinisolvans</i> strain LL-002	100%	99,26%	Tsubouchi, T. et al., 2015
CA2.2	NR_165946.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i> NRRL 895	100%	99,64%	Ridkaew, R., et al., 2020
CA2.9	NR_165946.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i> NRRL 895	100%	100%	Ridkaew, R., et al., 2020
CA3.9	NR_119813.1	<i>Penicillium wotroi</i> CBS 118171	100%	100%	Schoch, C. L. et al., 2014
1M9_3	MK521060.1	<i>Bacillus altitudinis</i> strain HTI 11	100%	100%	Zulkhairi A. et al., 2019
2M9_13	MN640962.1	<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain L11	100%	100%	Liu, Y. et al., 2019
3M9_15	MN398314.1	<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain B21	100%	100%	Jianwen, T. et al., 2019
3M9_16	MK205156.1	<i>Priestia megaterium</i> strain 4-13	100%	100%	Wu, J. 2018
1M9_4	NR_121224.1	<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 1841	98%	100%	Schoch, C. L. et al., 2014
1M9_9	NR_121224.1	<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 1841	99%	100%	Schoch, C. L. et al., 2014
2M9_10	MH268036.1	<i>Penicillium</i> sp. strain AHB27_1AB	100%	100%	Skaltsas, D. N. et al., 2019
2M9_12	MT949921.1	<i>Penicillium adametzii</i> strain CN014F8	94%	99,40%	Visagie et al., 2020
3M9_17	MT582791.1	<i>Penicillium sumatraense</i> strain DUCC5751	100%	99,13%	Ahn, G. et al., 2020
1SOY10	LN909032.1	<i>Paenibacillus</i> sp. SIT18	100%	100%	Urmite, Genomas. 2015
1SOY15	MH817399.1	<i>Staphylococcus</i> sp. strain R306	100%	100%	Dahal, R. H. 2018
2SOY23	MK014246.1	<i>Bacillus koreensis</i> strain RT18	100%	100%	Dixit, S. 2018
2SOY27	NR_164882.1	<i>Bacillus zanthoxyli</i> strain 1433	99%	100%	Li, M. et al., 2017
3SOY31	NR_164882.1	<i>Bacillus zanthoxyli</i> strain 1433	99%	99,55%	Li, M. et al., 2017

3SOY35	MK277458.1	<i>Gordonia hongkongensis strain 5-5 16S</i>	100%	100%	Lin, Y. B.; Hou, L. 2018
1SOY12	OL801349.1	<i>Aspergillus flavus isolate CBPF EAF1</i>	100%	89,76%	Senthilkumar et al., 2021

Legenda: NCBI – código de acesso a sequência no banco de dados Genbank; BLAST – descrição das espécies com maior similaridade obtidas na busca utilizando a ferramenta BLAST; (%) Índice Query Cover; ID – (%) Índice de similaridade genotípica.

Dentre os gêneros identificados entre os isolados bacterianos pela ferramenta BLAST, estão *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aneurinibacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* e *Gordonia*. Com destaque para gêneros *Streptomyces* e *Bacillus* os mais representados entre as sequências (n=2) e (n=13) respectivamente, conforme relatado anteriormente por Souza (2019), sendo os isolados LA 2.9, 2CA1, 2SOY27, 3SOY31 e 2LA15 identificados posteriormente.

A espécie LA 2.9 (2019) obteve similaridade genotípica com o registro curado da espécie *Bacillus clarus* cepa ATCC 21929 depositada no Genbank por Mendez, et al. (2022) ao investigar isolados do solo pertencem ao grupo *Bacillus cereus*, com base na análise das sequências do gene 16S rRNA.

A sequência do isolado 2CA1 (2018) obteve similaridade genotípica com a espécie *Priestia megaterium strain 22-A1* depositada no banco de dados Genbank. A espécie *Priestia megaterium strain 22-A1* (basiônimo ou nome original: *Bacillus megaterium* de Bary, 1884), coletada e depositada por Zheng et al. (2016), ao estudar bactérias solubilizadoras de fosfato. O isolado 2LA15 obteve similaridade com a espécie de *Priestia megaterium cepa ATCC 14581* depositada por Beesley et al. (2010) ao identificar e caracterizar de espécies 14 *Priestia megaterium* e quatro *Bacillus sp.* Além desses dois, outros quatro isolados também obtiveram similaridade genotípica com a espécie *Priestia megaterium*.

Os isolados 2SOY27 e 3SOY31 obtiveram similaridade genotípica com a espécie *Bacillus zanthoxyli strain 1433*, depositada por Li et al. (2017) ao isolar de folhas de pimenta vermelha chinesa (*Zanthoxylum bungeanum*) na China.

O gênero *Bacillus* possui cerca de 2.596 espécies e 124 subespécies, pertencendo à família Bacillaceae (PARTE et al., 2020; LPNS, 2023), as bactérias desse gênero são comumente conhecidas por serem formadoras de esporos e apresentarem propriedades benéficas usadas nas indústrias farmacêutica, agrícola e alimentícia, além exibirem a capacidade de produzir uma série de enzimas, antibióticos e outros metabólitos, possuem habilidades fisiológicas que permitem viver em todos os ambientes naturais, por seus esporos possuírem a facilidade de resistir ao calor, radiação e bem como a dessecação (PETER, 1996; GRUTSCH et al., 2018).

Semelhantemente pertencente à família Streptomycetaceae, o gênero *Streptomyces* também possuem espécies com a habilidade de formar esporos que produzem metabólitos secundários bioativos, como antibióticos, antifúngicos, antivirais, anti-hipertensivos antitumorais, imunossupressores (DE LIMA et al., 2012).

Ao avaliar a variação sazonal da atividade microbiana de PM_{2,5} e PM₁₀ na China, CHEN et al. (2021) relataram entre os principais gêneros identificados a partir de análise metagenômica do gene 16S rRNA ao nível de gênero, os gêneros bacterianos *Bacillus* (3,07%) e *Streptomyces* (1,87%) entre as amostras coletadas a 30 m acima do solo.

Federici et al. (2018) relataram em um levantamento taxonômico abrangente da comunidade bacteriana na poeira do Saara transportada pelo ar para região central do Mediterrâneo, com métodos baseados em cultura a partir de amostras PM₁₀ e PM_{2,5}, a presença dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* na coleção de 92 isolados.

Desse modo, os dados relatados corroboram com os dados descritos anteriormente, acerca de bactérias produtoras de esporos possuírem habilidades que as permitem viver em grande parte dos ambientes naturais. Bactérias cultiváveis desses gêneros possuem o potencial para serem metabolicamente ativas e resistirem à radiação ultravioleta (PETER, 1996; FEDERICI et al., 2018).

Quanto à similaridade genotípica das sequências dos isolados fúngicos também presente na TABELA 6, é possível observar que dos 13 isolados fúngicos identificados até o momento, 10 apresentaram similaridade genotípica com o gênero *Penicillium*, espécies pertencentes a esse gênero são comumente encontrados em diferentes substratos em todo o mundo, incluindo solo, ar, restos de plantas e produtos alimentícios, também se destaca por possuir por espécies capazes de produzir antibióticos (FLEMING, 1929; MOHR, 2016; GOULD, 2016; TORTORA, 2017; TORRES-GARCIA et al., 2022), estudos anteriores relataram encontrar alta diversidade de fungos no material particulado do ar, incluindo espécies do gênero *Penicillium* na Amazônia central (FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2009; BARBOSA, 2018; OLIVEIRA, 2022).

Dentre as sequências que apresentaram similaridade com espécies do gênero *Penicillium*, cinco (1LA3; 1LA4; 1LA11; 1M9_4 e 1M9_9) obtiveram 100% de similaridade com a espécie *Penicillium citrinum*, relatado na literatura como fungos endofíticos, apresenta a capacidade de melhorar o crescimento da planta, bem como

bons resultados na solubilização de fosfato (KHAN et al., 2008; HAKIM; YUWATI, 2020).

Ainda no que diz respeito ao gênero *Penicillium*, as sequências dos isolados fúngicos 2LA14 e 2M9_12 apresentaram similaridade com a sequência da espécie *Penicillium adametzii strain CN014F8* depositada no Genbank por Visagie et al., (2020), ao investigar novas espécies de *Penicillium* no sul da África.

O isolado 3M9_17 apresentou 99% de similaridade com a sequência da espécie *Penicillium sumatraense strain DUCC5751* depositada por Ahn, et al. (2020), em um estudo de caso sobre contaminação aérea por *Penicillium* no inverno na Coreia do Sul. A sequência do isolado CA3.9 obteve 100% de similaridade com a espécie *Penicillium wotroi CBS 118171* depositada por Schoch, et al. (2014) ao estudar e propor um conjunto de sequências de referência de marcadores que representam cada ordem atualmente aceita de fungos.

As sequências dos isolados fúngicos CA2.2 e CA2.9 obtiveram similaridade genotípica com a sequência curada do fungo *Purpureocillium lilacinum NRRL 895*, depositada por Ridkaew, et al. (2020), essa espécie é geralmente encontrada em uma ampla variedade de ambientes e vem sendo avaliada quanto a sua capacidade produzir metabólitos secundários com um potencial promissor para atuar como biocontrole (CHEN; HU, 2021; ELSHERBINY et al., 2021).

A sequência do isolado 1SOY12 apresentou similaridade genotípica com a espécie *Aspergillus flavus isolate CBPF EAF1* depositada no Genbank por Senthilkumar et al. (2021), em um estudo realizado por Oliveira et al. (2022) na Amazônia central com amostras de ar coletadas a 300 m de altura no topo da torre ATTO, ao analisar diversidade de fungos demonstrou que gêneros *Aspergillus* está entres os mais frequentes registrados.

A fim de agrupar taxonomicamente as sequências obtidas foram submetidas a análise pela ferramenta *Classifier* do *Ribosomal Database Project* (RDP), essa ferramenta é um classificador bayesiano, capaz classificar com rapidez e precisão sequências bacterianas de 16S rRNA e fúngicas de LSU e ITS, fornecendo atribuições taxonômicas confiáveis de domínio a gênero (WANG et al., 2007).

O resultado da classificação taxonômica pela ferramenta *Classifier* pode ser observado no GRÁFICO 5, onde é possível conhecer a classificação dos isolados identificados por reino (A), filo (B), classe (C), ordem (D), família (E) e gênero (F).

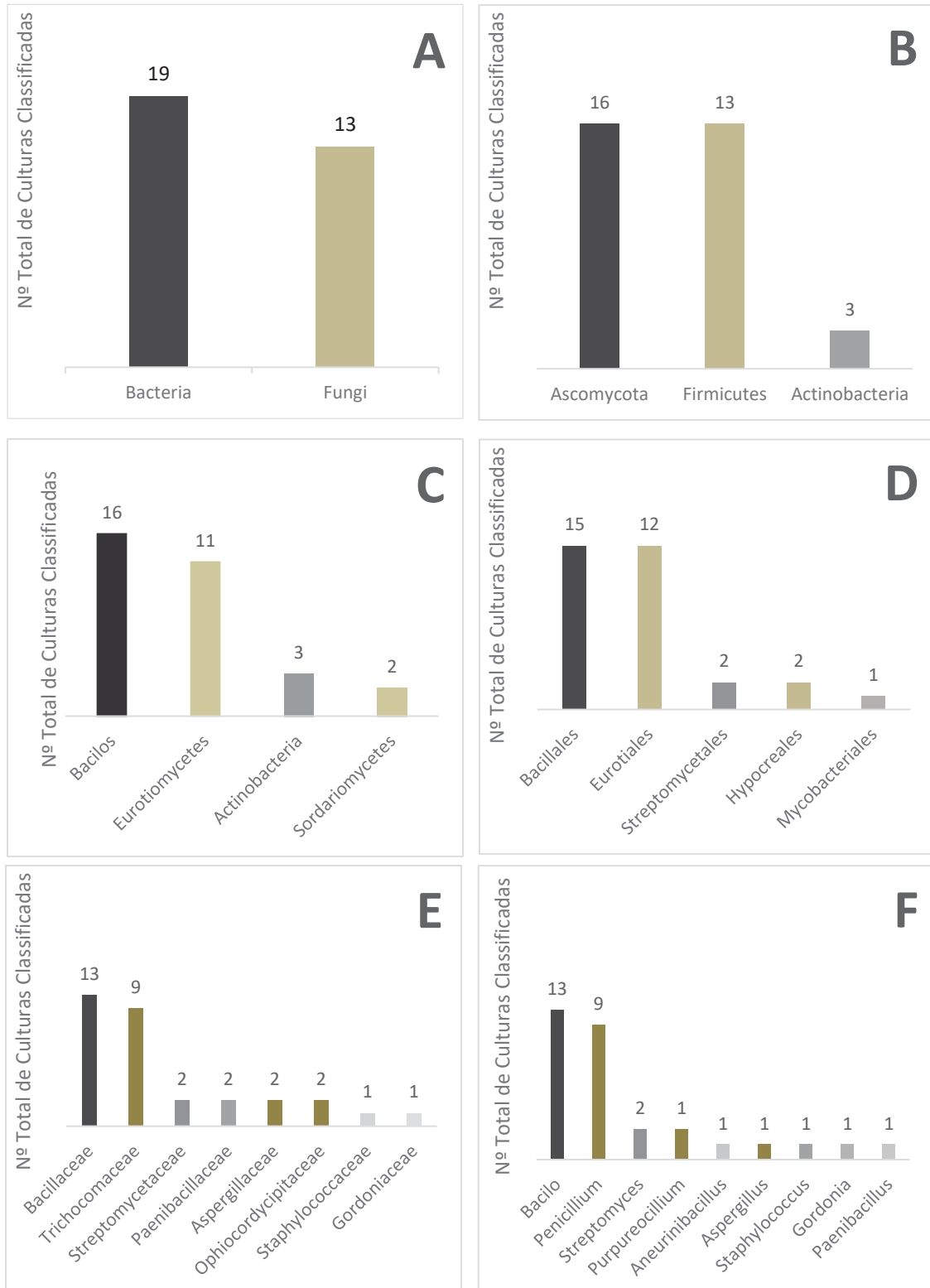
Ao observar o GRÁFICO 5 que ao nível de filo (B) é possível notar que entre os isolados de bioaerossóis cultiváveis identificadas até o momento, a maior parte das culturas isoladas pertencem ao filo *Ascomycota* (Reino fungi) e *Firmicutes*, seguidos dos filios *Actinobactéria* ou *Actinomicetos* (Reino bacteria). Sendo esses divididos em quatro Classes *Bacilos*, *Eurotiomycetes*, *Actinobacteria* e *Sordariomycetes* como é possível visualizar na parte (C) do gráfico. Ao nível de ordem (D) os isolados foram agrupados em *Streptomyetales*, *Eurotiales*, *Bacillales*, *Hypocreales* e *Mycobacteriales*. Quanto ao nível de família (E) é possível observar que entre as culturas isoladas a indivíduos pertencentes a oito famílias distintas, sendo as famílias *Bacillaceae* e *Trichocomaceae* com o maior número de isolados, seguidas das famílias *Streptomyetaceae*, *Paenibacillaceae*, *Aspergillaceae*, *Ophiocordycipitaceae*, *Staphylococcaceae* e *Gordoniaceae*.

Ao nível de gênero, a predominância de indivíduos agrupados foi maior para os gêneros *Bacilo* e *Penicillium*, seguidos dos gêneros *Streptomyces*, *Purpureocillium*, *Aneurinibacillus*, *Aspergillus*, *Staphylococcus*, *Gordonia* e *Paenibacillus*. Os dados obtidos no *Classifier* (RDP) confirmam a similaridade genotípica das sequências submetidas ao banco de dados Genbank pela ferramenta BLAST, demonstrando similaridade taxonômica para os mesmo os gêneros, com exceção das sequências do isolado fúngico 1SOY12 e do isolado bacteriano CA2.2, que na ferramenta *Classifier* (RDP) apresentaram similaridade inferior a 80% de similaridade e foram então descartadas da análise ao nível de gênero.

Ao analisar a composição de bactérias em bioaerossóis cultiváveis e não cultiváveis transportados pelo ar em partículas de poeira do deserto do Saara no mediterrâneo Federici et al. (2018) identificaram 49 espécies diferentes, pertencentes a 16 gêneros e quatro filios diferentes, sendo entre os filios mais abundantes relatados *Actinobacteria* com 45% do total de isolados, seguido por *Firmicutes* com 39% e depois *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* com 13% e 3%, respectivamente.

Romano et al., (2019) também relatam encontrar em bioaerossóis os filios *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* foram mais abundantes, ao analisar a diversidade de bactérias em amostras de PM₁₀ coletados a 10 metros do solo, na região central do Mediterrâneo.

GRÁFICO 5 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA PELA FERRAMENTA CLASSIFIER DO RIBOSSOMAL DATABASE PROJECT (RDP)



FONTE: AUTORA (2023).

LEGENDA: Classificação taxonômica das sequências dos isolados obtidas por sequenciamento SANGER, na ferramenta *Classifier* do *Ribosomal Database Project* (RDP). As sequências foram classificadas em nível de Reino (A), Filo (B), Classe (C), Ordem (D), Família (E) e Gênero (F). Todas as sequências foram analisadas usando a ferramenta com corte *bootstrap* a 80%. A ferramenta *Classifier* permite observar os táxons mais representativos entre as sequências analisadas.

Fröhlich-Nowoisky et al. (2009) relataram a alta diversidade de fungos aerotransportados em partículas de aerossóis coletados a 130 m de altitude na Alemanha, com a predominância de 64% dos filos para *Basidiomycota* e 34% para *Ascomycota*, das quais as principais classes relatadas nas amostras de ar foram *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes* e *Sordariomycetes*. Chen et al., (2021) relataram encontrar entre a composição da comunidade fúngica e bacteriana em bioaerossóis coletados em amostras de PM_{2.5} e PM₁₀ (material particulado) na China ao estudar variações sazonais, os filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*.

Em um estudo realizado por Oliveira et al. (2022) no sítio ATTO, com amostras coletadas 300 metros de altura, a autora e colaboradores relataram encontrar entre os gêneros frequentemente registrados nas amostras de ar os gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Periconia*, *Tinctoporellus*, *Fusarium* e *Phanerochaete*.

Em levantamento feito por Zhai et al. (2018), os autores relataram os gêneros mais registrados em relatórios relevantes sobre a composição fúngica de bioaerossóis, descrevendo os gêneros com maior número de espécies registrados *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Souza (2021), ao estudar a diversidade de bactérias por meio de análises metagenômicas do DNA total (bioaerossóis não cultiváveis) no interior da floresta amazônica no sítio ATTO, durante as estações seca e chuvosa demonstrou os táxons mais presentes ao nível de família nas amostras analisadas, sendo as famílias mais abundantes, *Enterobacteriaceae* (19%), *Beijerinckiaceae* (11%), *Polyangiaceae* (10%), *Bacillaceae* (5%) e *Ktedonobacteraceae* (5%). Além disso, os dez gêneros mais representados foram: *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pajaroellobacter*, *Ottowia*, *Acinetobacter*, *Cloacibacterium*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium* e *Sphingomonas*.

Esse mesmo estudo demonstrou ao analisar variáveis meteorológicas, que a microbiota presente em aerossóis biogênicos na floresta Amazônica é bem diversificada e impactada principalmente por mudanças sazonais de temperatura, umidade relativa e precipitação, demonstrando que a estação parece ser o principal fator na composição e decomposição do microbioma da comunidade bacteriana atmosférica.

Estudos anteriores relataram um número relativamente alto da presença de bactérias e fungos em águas atmosféricas, atuando como núcleos de condensação de nuvens e núcleos de gelo (IANNONE et al., 2011; MORRIS et al., 2011; DESPRÉS et al., 2012; HAGA et al., 2014; HU et al., 2018; GARCIA et al., 2019).

Garcia et al. (2019) relataram encontrar dezesseis gêneros de fungos e bactérias em gotículas de chuva, entre eles os gêneros *Bacilos*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Actinomycetales*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Ochrocladosporium*, sendo o procarioto *Bacillus* mais frequentemente detectado e *Cladosporium* o eucarioto mais frequente. Kourtev et al. (2011), encontraram em água atmosférica sete filos bacterianos diferentes entre eles os filos, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* demonstrando que nuvens atmosféricas contém uma comunidade bacteriana diversificada.

Haga et al. (2014) relataram encontrar propriedades de nucleação do gelo em 12 espécies diferentes de esporos fúngicos das classes, *Agaricomycetes*, *Ustilaginomycetes* e *Eurotiomycetes*, pertencentes aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*.

Desse modo, os resultados obtidos entre as coletas de bioaerossóis cultiváveis nos períodos de 2018 e 2019, corroboram com os resultados dos trabalhos acima citados.

3.3.4 Teste de suscetibilidade aos antibióticos

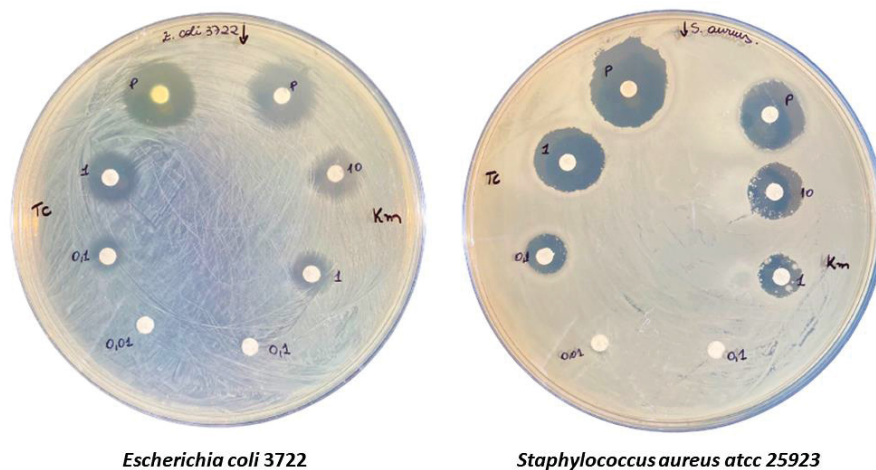
A fim de identificar a concentração inibitória com melhor desempenho frente as cepas bacterianas *Escherichia coli* NCM 3722 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para os ensaios de suscetibilidade antimicrobiana dos extratos secundários, os antibióticos Canamicina e Tetraciclina foram testados em diferentes concentrações. Canamicina (100 mg/mL, 10 mg/mL, 1 mg/mL e 0,1 mg/L) e Tetraciclina (10 mg/mL, 1 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL).

Utilizando a metodologia de ensaio *in vitro* de difusão em disco (BAUER et al. 1966), como é possível observar na FIGURA 16, quase todas as concentrações dos antibióticos apresentam halos de inibição, com exceção das concentrações 0,01 mg/mL para Tetraciclina frente às duas cepas testadas e na concentração 0,1 mg/mL para Canamicina. As concentrações 0,1 mg/mL de Tetraciclina e 1 mg/mL de Canamicina também foram descartadas por apresentarem halos inferiores a (14 mm),

de acordo com o NCCLS, (2005) halos inferiores a (≤ 14 mm) podem apresentar resistência microbiana. As contrações 100 mg/mL e 10 mg/mL do antibiótico Canamicina, bem como 10 mg/mL e 1 mg/mL da Tetraciclina apresentaram halos de inibição (≥ 18 mm) para às duas colônias testadas, demonstrando sensibilidade aos antibióticos testados de acordo com NCCLS (2005).

Por apresentar halos inibitórios com o crescimento de algumas colônias na zona de inibição, o antibiótico Canamicina foi descartado como controle positivo. Sendo então, selecionado como controle positivo para os ensaios de suscetibilidade antimicrobiana dos extratos do metabolismo secundários de fungos e bactérias, a concentração 1 mg/mL do antibiótico, por apresentar halos inibitórios (≥ 18 mm) para as duas colônias testadas, sendo esse resultado a concentração de 10 mg/mL.

FIGURA 16 – TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS CANAMICINA E TETRACICLINA



FONTE: AUTORA (2023).

LEGENDA: Tetraciclina (TC), 10 mg/mL (P), 1 mg/mL (1), 0,1 mg/mL (0,1) e 0,01 mg/mL (0,01).
Canamicina (KM), 100 mg/mL (P), 10 mg/mL (10), 1 mg/mL (1) e 0,1 mg/L (0,1).

Ainda segundo o NCCLS (2005), os microrganismos que apresentaram sensibilidade à tetraciclina, também apresentaram sensibilidade à doxiciclina e à minociclina.

3.3.5 Extração dos metabólitos secundários fúngicos e bacterianos

Dentre os 50 selecionados para extração dos metabólitos secundários, 12 isolados entre fungos e bactérias não apresentaram crescimento microbiano, sendo

entre esses oito isolados com similaridade genotípica parcialmente identificada no BLAST (NCBI): os isolados CA2.2 e CA2.9 (*Purpureocillium lilacinum* NRRL 895), 3SOY35 (*Gordonia hongkongensis* strain 5-5 16S), 2LA16 (*Priestia megaterium* strain 0329 Y-4), 3LA18 (*Streptomyces andamanensis* strain KC-112), 2M9_12 (*Penicillium adametzii* strain CN014F8), 1SOY15 (*Staphylococcus sp.* strain R306) e 2LA23 (*Bacillus koreensis* strain RT18). Na TABELA 7 é possível observar a descrição dos isolados selecionados para extração dos metabólitos secundários fúngicos e bacterianos, com ID de gênero dos isolados com sequências comparadas no banco de dados RDP.

TABELA 7 – DESCRIÇÃO DOS ISOLADOS SELECIONADOS PARA EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FÚNGICOS E BACTERIANOS

Cód.	Isolados	Reino	ID (RPD)	Crescimento	Extração
1	2M9-11	Bacteria	S / ID	+	**
2	2M9-13	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
3	3CA4	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
4	3M9-15	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
5	1SOY10	Bacteria	<i>Paenibacillus</i>	+	**
6	1M9-5	Bacteria	S / ID	+	**
7	1M9-3	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
8	2CA1	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
9	3M9-16	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
10	3CA5	Bacteria	<i>Aneurinibacillus</i>	+	**
11	3SOY31	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
12	LA2.9	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
13	1LA1	Bacteria	<i>Streptomyces</i>	+	**
14	2LA15	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
15	2SOY27	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
16	3CA3	Bacteria	<i>Bacillus</i>	+	**
17	1M9-6	Fungi	S / ID	+	**
18	1LA-9	Fungi	S / ID	+	**

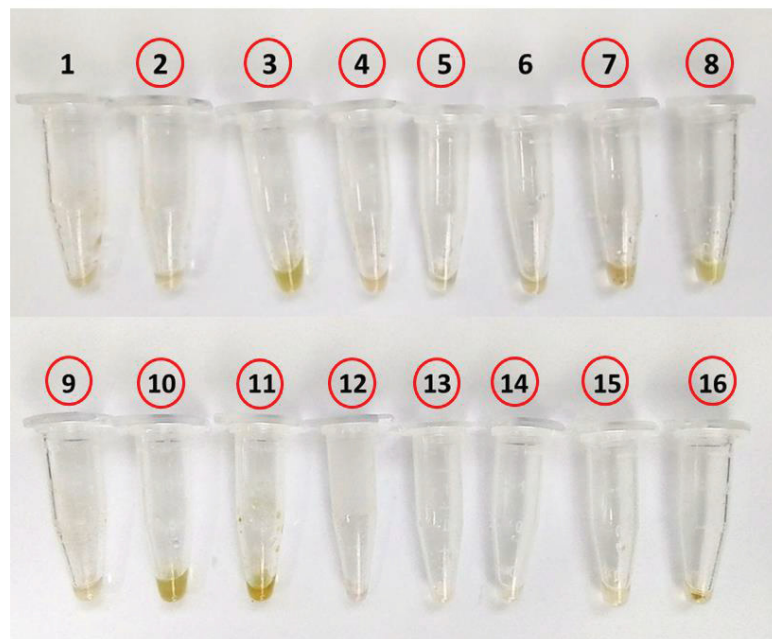
19	3LA20	Fungi	S / ID	+	**
20	1LA5	Fungi	S/ID	+	**
21	1LA10	Fungi	S/ID	+	**
22	1LA3	Fungi	<i>Penicillium</i>	+	**
23	1SOY8	Fungi	S/ID	+	**
24	2LA14	Fungi	<i>Penicillium</i>	+	**
25	1SOY14	Fungi	S/ID	+	**
26	2M9-10	Fungi	<i>Penicillium</i>	+	**
27	1LA11	Fungi	<i>Penicillium</i>	+	**
28	TS3.9	Fungi	S/ID	+	**
29	3SOY18	Fungi	S/ID	+	**
30	1SOY12	Fungi	<i>Aspergillus</i>	+	**
31	1LA4	Fungi	<i>Penicillium</i>	+	**
32	TS2.6	Fungi	S/ID	+	**
33	3M9-17	Fungi	<i>Penicillium</i>	+	**
34	CA3.9	Fungi	<i>Penicillium</i>	+	**
35	1M9-4	Fungi	<i>Penicillium</i>	+	**
36	3M9-18	Fungi	S/ID	+	**
37	2SOY24	Fungi	S/ID	+	**
38	1M9-9	Fungi	<i>Penicillium</i>	+	**
39	CA2.2	Fungi	<i>Purpureocillium</i>	-	-
40	CA2.9	Fungi	<i>Purpureocillium</i>	-	-
41	1LA2	Fungi	S/ID	-	-
42	LA2.2	Fungi	S/ID	-	-
43	1SOY15	Bacteria	<i>Staphylococcus</i>	-	-
44	2SOY23	Bacteria	<i>Bacillus</i>	-	-
45	3SOY35	Bacteria	<i>Gordonia</i>	-	-
46	TS3.10	Bacteria	S/ID	-	-
47	3M9-14	Bacteria	S/ID	-	-

48	2LA16	Bacteria	<i>Bacillus</i>	-	-
49	3LA18	Bacteria	<i>Streptomyces</i>	-	-
50	2M9-12	Fungi	<i>Penicillium</i>	-	-

A abreviações na tabela (Cód.) diz respeito aos códigos dos isolados ID de gênero dos isolados com sequências comparadas no banco de dados RDP. Isolados sem identificação representados por (S/ID); crescimento microbiano (+); ausência de crescimento microbiano e extrato secundário (-); produção de extrato (**).

Desse modo, foram obtidos um total de 38 extratos, sendo 16 extratos de origem bacteriana e 22 de origem fúngica. Entre os extratos dos isolados bacterianos 14 possuem similaridade genotípica com espécies descritas no BLAST e da mesma forma os extratos fúngicos com um total de 10 com identificação, como é possível observar na TABELA 7. Os extratos bacterianos estão representados pelos códigos (1 a 16) e os extratos fúngicos pelos códigos (17 a 38). É possível observar na FIGURA 17 e na FIGURA 18 a coloração dos extratos obtidos por meio do ácido Fórmico (1%) diluído em acetato de etila.

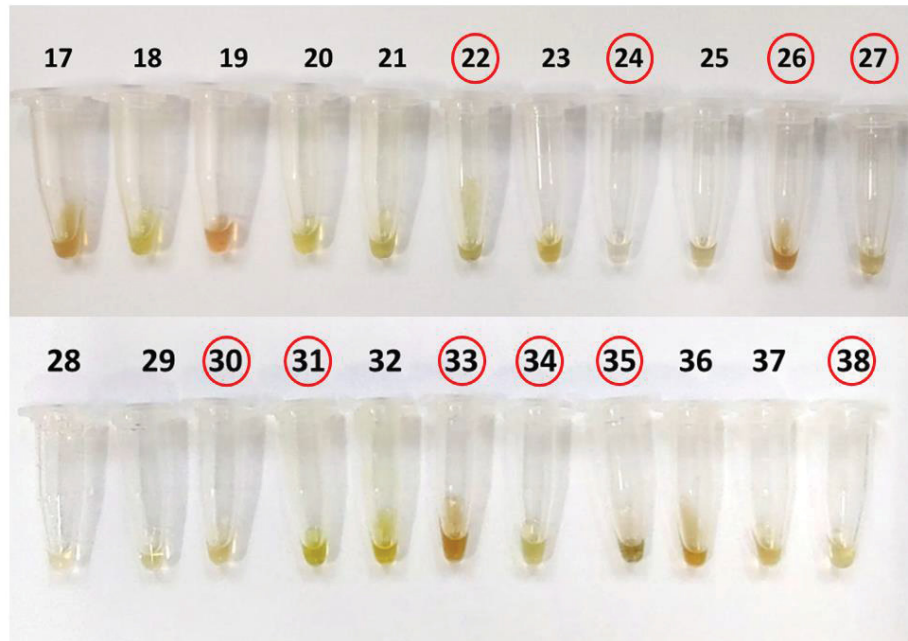
FIGURA 17 – EXTRATOS BACTERIANOS



AUTORA, (2023)

LEGENDA: Círculos vermelhos indicam extratos com identificação. Extratos bacterianos (1) 2M9_11; (2) 2M9_13; (3) 3CA4; (4) 3M9_15; (5) 1SOY10; (6) 1M9_5; (7) 1M9-3; (8) 2CA1; (9) 3M9_16; (10) 3CA5; (11) 3SOY31; (12) LA2.9; (13) 1LA1; (14) 2LA15; (15) 2SOY27; (16) 3CA3.

FIGURA 18 – EXTRATOS FÚNGICOS



AUTORA, (2023).

LEGENDA: Círculos vermelhos indicam extratos com identificação. Extratos fúngicos (17) 1M9_6; (18) 1LA_9; (19) 3LA20; (20) 1LA5; (21) - 1LA10; (22) 1LA3; (23) 1SOY8; (24) 2LA14; (25) 1SOY14; (26) 2M9_10; (27) 1LA11; (28) TS3.9; (29) 3SOY18; (30) 1SOY12; (31) 1LA4; (32) TS2.6; (33) 3M9-17; (34) CA3.9; (35) 1M9-4; (36) 3M9-18; (37) 2SOY24; (38) 1M9_9.

3.3.6 Teste de suscetibilidade antimicrobiana dos metabólitos secundários fúngicos e bacterianos

Os 38 extratos produzidos apresentaram halo de inibição com respectivas médias e desvio padrão descritos na TABELA 8.

TABELA 8 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO EXPRESSO EM MILÍMETROS DOS EXTRATOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS ISOLADOS BACTERIANOS E FÚNGICOS.

Cód.	Isolados	ID (RDP)	<i>E. coli</i> Média ± DPM (mm)	<i>S.aureus</i> Média ± DPM (mm)
1	2M9-11	S/ID	8,5 ± 0,7	-
2	2M9-13	<i>Bacillus</i>	5 ± 0,7	-
3	3CA4	<i>Bacillus</i>	-	-
4	3M9-15	<i>Bacillus</i>	-	-
5	1SOY10	<i>Paenibacillus</i>	14,5 ± 0,7	-
6	1M9-5	S/ID	8 ± 0	-

7	1M9-3	<i>Bacillus</i>	-	-
8	2CA1	<i>Bacillus</i>	8,5 ± 0,7	7,5 ± 0,7
9	3M9-16	<i>Bacillus</i>	-	-
10	3CA5	<i>Aneurinibacillus</i>	-	-
11	3SOY31	<i>Bacillus</i>	10,5 ± 0,7	7,5 ± 0,7
12	LA2.9	<i>Bacillus</i>	-	-
13	1LA1	<i>Streptomyces</i>	8 ± 0	-
14	2LA15	<i>Bacillus</i>	-	-
15	2SOY27	<i>Bacillus</i>	8 ± 0	7,5 ± 0,7
16	3CA3	<i>Bacillus</i>	-	-
17	1M9-6	S/ID	-	-
18	1LA-9	S/ID	9,5 ± 0,7	12 ± 0
19	3LA20	S/ID	8 ± 0	8 ± 0
20	1LA5	S/ID	8 ± 0	-
21	1LA10	S/ID	8 ± 0	-
22	1LA3	<i>Penicillium</i>	8,5 ± 0,7	-
23	1SOY8	S/ID	-	-
24	2LA14	<i>Penicillium</i>	8,5 ± 0,7	-
25	1SOY14	S/ID	-	-
26	2M9-10	<i>Penicillium</i>	-	-
27	1LA11	<i>Penicillium</i>	8 ± 0	-
28	TS3.9	S/ID	8 ± 0	7,5 ± 0,7
29	3SOY18	S/ID	-	-
30	1SOY12	<i>Aspergillus</i>	7 ± 0	-
31	1LA4	<i>Penicillium</i>	9 ± 0	-
32	TS2.6	S/ID	7,5 ± 0,7	-
33	3M9-17	<i>Penicillium</i>	-	-
34	CA3.9	<i>Penicillium</i>	-	-
35	1M9-4	<i>Penicillium</i>	-	-
36	3M9-18	S/ID	-	-
37	2SOY24	S/ID	8,5 ± 0,7	7 ± 0
38	1M9-9	<i>Penicillium</i>	8 ± 0	7,5 ± 0,7
Controles				
Controle positivo*			18,1 ± 0,3	22,1 ± 1,4
Controle negativo**			-	-

ID de gênero dos isolados com sequências comparadas no banco de dados RDP. Os valores representam a média ± DPM (desvio padrão da média) em mm. Tetraciclina 1 mg/mL (*); DMSO e Metanol 1:1 (**); não apresentou halo de inibição (-).

De todos os 38 extratos avaliados 21 apresentaram formação de halos de inibição. 55% dos extratos apresentaram halos de inibição frente a bactéria Gram-negativa *E. coli* e 21% contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. A bactéria Gram-

negativa se mostrou mais sensível à ação dos extratos de metabólitos testados nesse estudo.

Embora bactérias Gram-negativas sejam um pouco mais resistentes a ação dos antibióticos devido à natureza de suas paredes celulares, que limitam a absorção de algumas moléculas, isso ocorre devido à toxicidade seletiva de ação antibacteriana presente na camada externa de lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas e nas porinas, que formam canais aquosos através da membrana, fármacos compostos por moléculas pequenas e hidrofílicas, afetam bactérias Gram-negativas com maior facilidade (TORTORA, 2017).

Desse modo, fármacos que atravessam os canais de porinas precisam ser relativamente pequenos e hidrofílicos, neste sentido, alguns dos antibióticos mais ativos contra bactérias gram-negativas, podem ser citados Ceftazidima, Cefalotina, Polimixina B, Aztreonam, Quinolona, Ciprofloxacino, Levofloxacino e Aminoglicosídeo (TORTORA, 2017). Outro fator relevante que pode estar associado, são as diferenças nos tempos de duplicação entre *E. coli* e *S. aureus* uma vez que, o tamanho dos halos de inibição também dependerá desta variante (GONÇALVES et al., 2018).

Entre 38 extratos avaliados, 50% apresentaram halos de inibição inferiores a (≤ 10 mm) e apenas 5% apresentaram halos de inibição superiores (≥ 10 mm) frente a bactéria *E. coli*. Frente a *S. aureus*, 18% apresentaram halos inibitórios inferiores a (≤ 10 mm) e 2,63% superiores (≥ 10 mm). Desses apenas oito extratos apresentaram halos de inibição frente às duas cepas testadas, entre espécies com e sem identificação.

Entre os 24 extratos avaliados com similaridade genotípica parcialmente identificada no BLAST (NCBI), os extratos dos isolados 2M9_13 (*Bacillus sp.* strain L11), 1SOY10 (*Paenibacillus sp.* SIT18), 1LA1 (*Streptomyces misionensis* strain PDS80), 2LA14 (*Penicillium adametzii* strain CN014F8), 1SOY12 (*Aspergillus flavus* isolate CBPF EAF1), 1LA4 (*Penicillium citrinum* isolate 1R) 1LA3 e 1LA11 (*Penicillium citrinum* NRRL 1841) apresentaram halos de inibição apenas frente a bactéria Gram-negativa (*E. coli*), enquanto os extratos dos isolados 2CA1 (*Priestia megaterium* strain 22-A1); 3SOY31 e 2SOY27 (*Bacillus zanthoxyli* strain 1433) e 1M9_9 (*Penicillium citrinum* NRRL 1841) apresentaram halos de inibição frente às duas bactérias testadas. Totalizando 12 extratos com atividade antibacteriana com espécies descritas.

Considerado uma fonte promissora de metabólitos secundários bioativos o gênero *Bacilo*, vem sendo muito estudado ao longo dos anos, na busca de compostos que possuam componentes com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, neste sentido Xie et al. (2021) testaram os compostos ácido beênico, β -sitosterol e ácido fenilacético isolados da espécie *Priestia megaterium* L2, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, por meio do método de microdiluição em caldo, os compostos bioativos testados se mostram promissores como agentes antimicrobianos naturais, demonstrando ação frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas.

Ao investigar a espécie *B. zanthoxyli* HS1 Usmonov et al. (2021), mostram que a espécie *B. zanthoxyli* pode suprimir o desenvolvimento de doenças causadas por *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomate.

O gênero *Streptomyces* está entre um dos gêneros mais importantes com a capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos utilizados na produção de antibióticos (EMERSON et al., 2012). Ilhem et al. (2020) descreveram o isolamento e identificação de metabólitos secundários antimicrobianos produzidos por *Streptomyces misionensis* V16R3Y1 isolada da rizosfera de tamareiras (sul da Tunísia).

Os autores mostraram que a cepa *Streptomyces misionensis* avaliada apresentou uma ampla gama de atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas humanas *Escherichia fergusonii*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de atividades antifúngicas contra *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida metapsilosis* e *Candida parapsilosis*.

O gênero *Penicillium* também é um importante gênero na produção de antibióticos. MEFTEH et al. (2018) analisaram a atividade antibacteriana e antifúngica dos metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados da tamareira (*Phoenix dactylifera*). Entre as espécies identificadas e analisadas o fungo *Penicillium citrinum* TDPEF34, mostrou-se eficaz nos ensaios contra três bactérias patogênicas, incluindo duas bactérias Gram-positivas *Bacillus thuringiensis* e *Enterococcus faecalis* e uma bactéria Gram-negativa *Salmonella enterica*. Inibindo também o crescimento fúngico das espécies *Trichoderma* sp., *Fusarium sporotrichioides*, *Trichoderma* sp. No entanto, não foram encontrados registros anteriores a cerca de avaliação da atividade

antibacteriana de metabólitos secundários da espécie *Penicillium adametzii*, podendo esse estudo ser o primeiro a relatar atividade dessa espécie frente a bactéria Gram-negativa (*E. coli*) e a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*).

Ao analisar o potencial antibacteriano de compostos bioativos de uma espécie de *Aspergillus flavus*, Saeed et al. (2021) testaram o composto puro extraído da espécie de *Aspergillus flavus* cuja fórmula $C_{14}H_{14}O_5$ se mostrou eficaz exibindo potencial antibacteriano contra as cepas testadas.

Romanenko et al. (2008), ao pesquisarem bactérias heterotróficas cultiváveis associadas à concha marinha *Anadara truxeni* presente no Mar do Japão, testaram seis cepas Gram-positivas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Saccharothrix*, incluindo uma espécie do gênero *Paenibacillus* e duas cepas Gram-negativas relacionadas a *Pseudomonas* e *Sphingomonas*, à sua capacidade de inibir o crescimento microbiano, todas as espécies testadas possuíam atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas testadas.

Entre as espécies sem descrição genética, os extratos secundários dos isolados 2M9_11, 1M9_5, 1LA5, 1LA10, TS2.6 apresentaram halos de inibição apenas frente a bactéria *E. coli*, enquanto os extratos 1LA_9, 2SOY24, TS3.9 e 3LA20 apresentaram halos de inibição frente às duas bactérias testadas.

O mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos é bem compreendido atualmente, esses podem agir de diferentes maneiras no organismo alvo, iniciando com a interação física das moléculas e seus alvos específicos, processo que envolve mudanças bioquímicas, moleculares e estruturais, atuando em múltiplos alvos celulares, podendo atuar na inibição da replicação e transcrição de ácidos nucleicos, síntese de proteínas, ou até mesmo na célula síntese da parede celular (EMERSON et al. 2012; TORTORA, 2017).

4 CONCLUSÕES

- As coletas de bioaerossóis cultiváveis nos períodos de 2018 e 2019, resultaram no cultivo e isolamento de 200 culturas entre fungos e bactérias, desses 32 foram identificados até o momento.
- No inventário sobre a diversidade microbiana dos isolados identificados até o momento, foi possível observar a predominância dos filos *Ascomycota*, *Firmicutes* e *actinobactéria*. Entre a diversidade de gêneros a predominância de *Bacillus* e *Penicillium*, seguidos dos gêneros *Streptomyces*, *Purpureocillium*, *Aneurinibacillus*, *Aspergillus*, *Staphylococcus*, *Gordonia* e *Paenibacillus*. Os filos, classes e gêneros relatados neste estudo, são descritos na literatura como microrganismos bioativos, envolvidos no ciclo hidrológico ou atuando em ciclos biogeoquímicos vitais para a manutenção da floresta amazônica.
- O processo interativo entre a identificação molecular baseada em DNA e MALDI-TOF, contribuiu para a geração de espectros de referências, auxiliando na criação de um banco de dados espectral com o MSP obtido dos isolados no sítio ATTO, podendo facilitar futuras investigações sobre a diversidade das comunidades de fungos e bactérias em amostras ambientais.
- Dos 38 extratos produzidos pelo metabolismo secundário dos isolados avaliados, 55% dos extratos apresentaram halos de inibição, demonstrando potencial de ação antibacteriana.
- Entre os extratos com atividade, 12 são oriundos de isolados com espécie descritas, pertencendo a gêneros como *Penicillium*, *Streptomyces* e *Bacillus*, que são organismos conhecidos na literatura como produtores de uma variedade de metabólitos secundários com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais.
- Entre as culturas identificadas, 18,75% apresentaram similaridade genotípica com a espécie *P. megaterium*, bactérias dessa espécie são conhecidas na literatura como solubilizadoras de fosfato.
- Para próximos trabalhos, sugerimos o estudo desses isolados, para verificação de potenciais solubilizadores de fosfato, bem como, a investigação da composição majoritária dos perfis de metabólitos secundários, presentes nos extratos.

Os resultados obtidos sobre a comunidade microbiana na atmosfera da Amazônia central, podem fornecer uma referência necessária para estudos posteriores em sobre a composição microbiológica cultivável do material particulado atmosférico em ambientes de floresta.

REFERÊNCIAS

- ABDILLAH, A.; Ranque, S. MalaSelect: A Selective Culture Medium for *Malassezia* Species. **J. Fungi**. v. 7, n. 824, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof7100824>>. Acesso em: 24/05/2023.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283605803602?via%3Dihub>>. Acesso em: 28/12/2022.
- BAUER, A. W. KIRBY, W. M. SHERRIS, J. C. TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**. 1966 Apr;45(4):493-6. PMID: 5325707.
- BEESELEY, C. A.; VANNER, C.; HELSEL, L. O.; GEE, J. E.; HOFFMASTER, A. R. Identification and characterization of clinical *Bacillus* spp. isolates phenotypically similar to *Bacillus anthracis*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 313, n. 1, p. 47–53, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02120.x>>. Acesso em: 30/05/2023.
- BODOR, A.; BOUNEDJOURN, N.; VINCZE, G. E.; et al. Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, n. 1, p. 1–22, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-020-09522-4>>. Acesso em: 04/01/2023.
- BONNET, M.; LAGIER, J. C.; RAOULT, D.; KHELAIPIA, S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. **New Microbes and New Infections**, v. 34, p. 100622, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6961714/>>. Acesso em: 04/01/2023.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 17/01/2023.
- CARBONNELLE, E.; BERETTI, J.-L.; COTTYNS.; et al. Rapid Identification of *Staphylococci* Isolated in Clinical Microbiology Laboratories by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2156–2161, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17507519/>>. Acesso em: 14/01/2023.
- CARBONNELLE, E.; GROHS, P.; JACQUIER, H.; et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n. 2, p. 133–136, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.03.003>>. Acesso em: 12/01/2023.
- CHEN, W.; HU, Q. Secondary Metabolites of *Purpureocillium lilacinum*. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 18, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/1/18>>. Acesso em: 24/01/2023.

CHEN, H.; DU, R.; ZHANG, Y.; et al. Survey of background microbial index in inhalable particles in Beijing. **Science of The Total Environment**, v. 757, p. 143743, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720372740>>. Acesso em: 10/02/2023.

DE LIMA PROCÓPIO, R. E.; DA SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; DE AZEVEDO, J. L.; DE ARAÚJO, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466–471, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>>. Acesso em: 20/01/2023.

DESPRÉS, V. R.; HUFFMAN, A. J. BURROWS, S. M. HOOSE, C. SAFATOV, A. S. BURYAK, G. FRÖHLICH-NOWOISKY, J. ELBERT, W. ANDREAE, M. O. PÖSCHL U. et al., Primary biological aerosol particles in the atmosphere: A review, **Tellus Ser. B Chem. Phys. Meteorol.** v. 64, n. 1, 15598. 2012.

DÖBEREINER, I.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, I.1. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. - Brasília: EMBRAPA - SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, dez. 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

DRISSNER, D.; FREIMOSER, F. M. MALDI-TOF mass spectroscopy of yeasts and filamentous fungi for research and diagnostics in the agricultural value chain. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://chembioagro.springeropen.com/articles/10.1186/s40538-017-0095-7#Sec4>>. Acesso em: 13/01/2023.

ELSHARBINY, E. A.; TAHER, M. A.; ABD EL-AZIZ, M. H.; MOHAMED, S. Y. Action mechanisms and biocontrol of *Purpureocillium lilacinum* against green mould caused by *Penicillium digitatum* in orange fruit. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 3, p. 1378–1390, 2021. Disponível em: <<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.15016>>. Acesso em: 24/01/2023.

EMERSON; FABIANE, I.; MARTINS, M.; DE, L.; MAGALI. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 16, n. 5, p. 466–471, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867012001341?via%3Dihub>>. Acesso em: 02/06/2023.

MEFTEH F. B.; DAOUD, A.; ALI CHENARI BOUKET; et al. Date Palm Trees Root-Derived Endophytes as Fungal Cell Factories for Diverse Bioactive Metabolites. **Int. J. Mol. Ciência**. v. 19, n. 7, p. 1986–1986, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/1986>>. Acesso em: 02/06/2023.

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**, v. 106, n. 31, p. 12814–12819, 2009. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0811003106>>. Acesso em: 23/01/2023.

FRÖHLICH-NOWOISKY, J. et al. Bioaerosols in the earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. **Atmos. Res.** v.182, p. 346-376, dez. 2016

GARCIA, E. B.; HANLON, R.; MAKRIS, M. R.; et al. Microbial diversity of individual raindrops collected from simulated and natural precipitation events. **Atmospheric Environment**, v. 209, p. 102–111, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1352231019302389>>. Acesso em: 20/01/2023.

GONÇALVES, M. V. S. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus*. **Ciência e Natura**. v. 40, n. 2. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.5902/2179460X27569>>. Acesso em: 03/06/2023.

GRUTSCH, A. A.; NIMMER, P. S.; PITTSLEY, R. H.; MCKILLIP, J. L. Bacillus spp. as Pathogens in the Dairy Industry. **Foodborne Diseases**, p. 193–211, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00007-5>>. Acesso em: 17/01/2023.

HADZIAVDIC, K.; LEKANG, K.; LANZEN, A.; et al. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. (C. R. Voolstra, Org.) **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87624, 2014. Disponível em: <[10.1371/journal.pone.0087624](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624)>. Acesso em: 29/12/2022.

HAGA, D. I.; BURROWS, S. M.; IANNONE, R.; et al. Ice nucleation by fungal spores from the classes Agaricomycetes, Ustilaginomycetes and Eurotiomycetes, and the effect on the atmospheric transport of these spores. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 14, n. 16, p. 8611–8630, 2014. Disponível em: <<https://acp.copernicus.org/articles/14/8611/2014/>>. Acesso em: 26/01/2023.

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

HAHN, M. W.; KOLL, U.; SCHMIDT, J. Isolation and Cultivation of Bacteria. **Advances in Environmental Microbiology**, p. 313–351, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-16775-2_10>. Acesso em: 04/01/2023.

HAKIM, S. S.; YUWATI, T. W. The Use of Fungal Endophyte *Penicillium citrinum* on Tree Seedling: Applicability and Limitation. (D. H. Mursyidin & E. Badruzsaufari, Orgs.) **BIO Web of Conferences**, v. 20, p. 03005, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/bioconf/20202003005>>. Acesso em: 24/01/2023.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Curr Opin Microbiol.** v. 1 n. 3: p. 278-85. 1998.

HOFER, U. The majority is uncultured. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 716–717, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-018-0097-x>>. Acesso em: 05/01/2023.

HU, W.; NIU, H.; MURATA, K.; et al. Bacteria in atmospheric waters: Detection, characteristics and implications. **Atmospheric Environment**, v. 179, p. 201–221, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.02.026>>. Acesso em: 20/01/2023.

HUERGO, L.F. **Regulação do metabolismo do nitrogênio em Azospirillum brasiliense**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

IANNONE, R.; CHERNOFF, D. I.; PRINGLE, A.; MARTIN, S. T.; BERTRAM, A. K. The ice nucleation ability of one of the most abundant types of fungal spores found in the atmosphere. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 11, n. 3, p. 1191–1201, 2011. Disponível em: <<https://acp.copernicus.org/articles/11/1191/2011/>>. Acesso em: 26/01/2023.

ILHEM SAADOULI; EL, Z.; EMNA TRABELSI; et al. Isolation, Characterization and Chemical Synthesis of Large Spectrum Antimicrobial Cyclic Dipeptide (l-leu-l-pro) from Streptomyces misionensis V16R3Y1 Bacteria Extracts. A Novel 1H NMR Metabolomic Approach. **Antibiotics**, v. 9, n. 5, p. 270–270, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/9/5/270>>. Acesso em: 02/06/2023.

JOHNSON, M.; ZARETSKAYA, I.; RAYTSELIS, Y.; et al. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server, p. W5–W9, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18440982/>>. Acesso em: 28/12/2022.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

KHAN, S. A.; HAMAYUN, M.; YOON, H.; et al. Plant growth promotion and Penicillium citrinum. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-231>>. Acesso em: 24/01/2023.

KUMAR, S. STECHER, G. TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 33, p. 1870-1874, 2016.

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

LI, M.; HONG, C.; WANG XIAO YAN; et al. Bacillus zanthoxyli sp. nov., a novel nematicidal bacterium isolated from Chinese red pepper (Zanthoxylum bungeanum Maxim) leaves in China. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 110, n. 9, p. 1179–1187,

2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-017-0890-y>>. Acesso em: 30/05/2023.

LIU, Y.; DU, J.; LAI, Q.; et al. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 2499–2508, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>>. Acesso em: 21/01/2023.

LOCEY, K. J.; FISK, M. C.; LENNON, J. T. Microscale Insight into Microbial Seed Banks. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.02040/full>>. Acesso em: 05/01/2023.

LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/>>. Acesso em: 17/01/2023.

MACHADO, H.B.; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. The ntrBC genes of *Azospirillum brasilense* are part of nifR3-like-ntrB-ntrC operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p.674-684, 1995.

MANCINI, N.; DE CAROLIS, E.; INFURNARI, L.; et al. Comparative Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Systems for Identification of Yeasts of Medical Importance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2453–2457, 2013. Disponível em: <DOI: 10.1128/JCM.00841-13>. Acesso em: 12/01/2023.

MORRIS, C. E.; SANDS, D. C.; BARDIN, M.; et al. Microbiology and atmospheric processes: research challenges concerning the impact of airborne micro-organisms on the atmosphere and climate. **Biogeosciences**, v. 8, n. 1, p. 17–25, 2011. Disponível em: <<https://bg.copernicus.org/articles/8/17/2011/>>. Acesso em: 26/01/2023.

NAKAMURA, K. et al. Culture-independent method for identification of microbial enzyme-encoding genes by activity-based single-cell sequencing using a water-in-oil microdroplet platform. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep22259>>. Acesso em: 4/01/2023.

NCCLS. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15^o Suplemento Informativo. **National Committee for Clinical Laboratory Standards publication** - Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos. ISSN: 0273-3099. v. 25 n. 1, 2005.

OLIVEIRA, M. et al. Life is in the air: An expedition into the Amazonian atmosphere. **Frontiers in Ecology and Evolution**. v. 10, n. 789791, 2022. Disponível em: <doi: 10.3389/fevo.2022.789791>. Acesso em: 22/05/2023.

OTLEWSKA, A.; ADAMIAK, J.; GUTAROWSKA, B. Application of molecular techniques for the assessment of microorganism diversity on cultural heritage objects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 2, 2014. Disponível em: <<https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/article/view/1889>>. Acesso em: 07/01/2023.

PANIZZON, J. P.; PILZ JÚNIOR, H. L.; KNAAK, N.; et al. Microbial Diversity: Relevance and Relationship Between Environmental Conservation And Human Health. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 1, p. 137–145, 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/babt/a/fLYqdR9CZX6x6WgMnXYc7jd/?lang=en>>. Acesso em: 04/01/2023.

PARTE, A. C.; SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; REIMER, L. C.; GÖKER, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607–5612, 2020. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004332>>. Acesso em: 17/01/2023.

PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Aeromicrobiology. **Environmental Microbiology**, p. 89–110, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123946263000053?via%3Dihub>>. Acesso em: 05/01/2023.

PETER. Bacillus. In: Baron S. 4th (ed.). **Medical Microbiology**, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/#:~:text=Bacillus%20species%20are%20rod%2Dshaped,live%20in%20every%20natural%20environment.>>. Acesso em: 17/01/2023.

PIZZOL, M. M. D. **Eficácia e segurança da cicloheximida como aditivo antifúngico no Optisol GS**. Dissertação (Mestrado em Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2020.

PONTES, D. S.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; CHARTONE-SOUZA, E.; AMARAL NASCIMENTO, A. M. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 463–473, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jimb/article/34/7/463/5993046?login=false>>. Acesso em: 04/01/2023.

RYCHERT, J. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. **Journal of Infectiology and Epidemiology**, v. 2, n. 4, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.29245/2689-9981/2019/4.1142>>. Acesso em: 12/01/2023.

ROMANO, S.; DI SALVO, M.; RISPOLI, G.; et al. Airborne bacteria in the Central Mediterranean: Structure and role of meteorology and air mass transport. **Science of The Total Environment**, v. 697, p. 134020, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004896971933997X>>. Acesso em: 20/01/2023.

ROMANENKO, L. A.; UCHINO, M.; KALINOVSKAYA, N. I.; MIKHAILOV, V. V. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities. **Microbiological Research**. v. 163, n. 6, p. 633–644, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.001>>. Acesso em: 02/06/2023.

SAEED U. K.; GHOSHIA L.; I., Z. et al. Aspergillus flavus originated pure compound as a potential antibacterial. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-021-02371-3>>. Acesso em: 02/06/2023.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

ŠANTL-TEMKIV, T. F. et al., Bioaerosol field measurements: Challenges and perspectives in outdoor studies. **Aerosol Sci. Technol.** 1–27. 2019.

SANGER, F.; NICKLENS, S.; COULSON, A R. **DNA sequencing with chainterminating inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 74, n. 12, p. 5463–7, United States of America. 1977.

SARMIENTO-VIZCAÍNO, A. et al. Pharmacological Potential of Phylogenetically Diverse Actinobacteria Isolated from Deep-Sea Coral Ecosystems of the Submarine Avilés Canyon in the Cantabrian Sea. **Microb Ecol.** v. 73, n.2, p. 338-352, 2017. Disponível em: <Doi: 10.1007/s00248-016-0845-2>. Acesso: 24/04/2023.

SCHOCH, C. L.; ROBBERTSE, B.; ROBERT, V.; et al. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. **Database**, v. 2014, n. 0, p. bau061–bau061, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24980130/>>. Acesso em: 28/12/2022.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00791/full>>. Acesso em: 16/12/2022.

SOUZA, F. F. C. **Análise da biodiversidade de procariotos em bioaerossóis na Estação Científica Uatumã, Amazônia**. Dissertação (Mestrado Desenvolvimento Territorial Sustentável) - Setor de Litoral, Universidade Federal do Paraná. Matinhos, 2019.

SOUZA, F. F. C. et al. Uncovering prokaryotic biodiversity within aerosols of the pristine Amazon Forest. **Science of The Total Environment**. v. 688: 83-86. 2019.

SOUZA, F. F. C. et al. Influence of seasonality on the aerosol microbiome of the Amazon rainforest. **Science of The Total Environment**. v. 760, n. 144092, ISSN 0048-969. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144092>>. Acesso:20/03/22.

SYUHADA, N. H. et al. Resistência forte e generalizada à cicloheximida em táxons de algas eucarióticas semelhantes a Stichococcus. **Sci. Rep.** v. 12, n. 1080, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-05116-y>>. Acesso em: 29/05/2023.

TORRES-GARCIA, D.; GENÉ, J.; GARCÍA, D. New and interesting species of *Penicillium* (Eurotiomycetes, Aspergillaceae) in freshwater sediments from Spain. **MycoKeys**, v. 86, p. 103–145, 2022. Disponível em: <<https://mycokeys.pensoft.net/article/73861/>>. Acesso em: 24/01/2023.

TORTORA, G. J. Microbiologia [recurso eletrônico] / Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case; tradução: Danielle Soares de Oliveira Daian, Luis Fernando Marques Dorvillé ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca, Ana Paula Guedes Frazzon, Jeverson Frazzon. – 12. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2017.

USMONOV, A; YOO, S.-J.; KIM, S.; et al. The *Bacillus zanthoxyli* HS1 Strain Renders Vegetable Plants Resistant and Tolerant against Pathogen Infection and High Salinity Stress. **Plant Pathol J.** v. 37, n. 1, p. 72–78, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7847759/>>. Acesso em: 02/06/2023.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17586664/>>. Acesso em: 15/12/2022.

WHIFFEN A. J. The production, assay, and antibiotic activity of Actidione, an antibiotic from *Streptomyces griseus*. **Journal of Bacteriology**, v. 56 p. 283–291, 1948.

WHIFFEN A. J. The activity *in vitro* of cycloheximide (Acti-dione) against fungi pathogenic to plants. **Mycologia**. v. 42 p. 253–258, 1950.

XIE, Y.-D.; PENG, Q.; YUYU, J.; et al. Isolation and Identification of Antibacterial Bioactive Compounds From *Bacillus megaterium* L2. **Frente. Microbiol.** v. 12, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.645484/full>>. Acesso em: 02/06/2023.

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: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041201732055X#bb0070>>. Acesso em: 26/01/2023.

ZHANG, Z. SCHWARTZ, S. WAGNER L. MILLER, W. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. **Journal of Computational Biology**. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/10665270050081478>>. Acesso em: 15/12/2022.