

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**  
**AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

**AMOSTRAGEM AEROBIOLÓGICA DE *ASPERGILLUS***  
***WELWITSCHIAE* COLETADOS COM VANT (1-100 M DE ALTURA)**  
**NO SEMIÁRIDO DA BAHIA, BRASIL**

**MARÍLIA MARTINELLI GUIMARÃES BARROS**

**CRUZ DAS ALMAS – BA**  
**JULHO – 2020**

**AMOSTRAGEM AEROBIOLÓGICA DE *ASPERGILLUS*  
*WELWITSCHIAE* COLETADOS COM VANT (1-100 M DE ALTURA)  
NO SEMIÁRIDO DA BAHIA, BRASIL**

**MARÍLIA MARTINELLI GUIMARÃES BARROS**

Bióloga

Universidade de Pernambuco – UPE, 2014.2

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dra. Ana Cristina Fermino Soares

Coorientador: Dr. José Luís Bezerra

**CRUZ DAS ALMAS – BA**

## FICHA CATALOGRÁFICA

B277a Barros, Marília Martinelli Guimarães.  
Amostragem aerobiológica de *Aspergillus welwitschiae* coletados com Vant (1-100 m de altura) no Semiárido da Bahia, Brasil / Marília Martinelli Guimarães Barros. Cruz das Almas, Bahia, 2020.  
64f.; il.

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares.  
Coorientador: José Luís Bezerra.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Microbiologia Agrícola.

1.Sisal – Doenças e pragas. 2.Fungos na agricultura – Atmosfera – Controle biológico. 3.Semiárido – Bahia – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.59

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).  
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
MARÍLIA MARTINELLI GUIMARÃES BARROS**

Dra. Ana Cristina Fermino Soares  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dr. Aristóteles Góes-Neto  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola a \_\_\_\_\_.”

A minha filha Fátima

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela proteção e força.

Ao meu esposo José Ricardo pela parceria, amor e compreensão.

Aos meus pais Maria das Graças e Marcos Antônio pelo incentivo e amor.

Ao meu irmão Marcos Herllan, pelo companheirismo.

A professora Ana Cristina Fermino Soares pela orientação, suporte e confiança.

Ao meu coorientador professor José Luís Bezerra pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

Aos estudantes e funcionários do bloco de laboratórios L: As técnicas Lene e Verônica, os colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e do Laboratório de Biologia do Solo pela troca de conhecimentos e momentos de descontração.

A equipe do laboratório G-Terf, especialmente ao professor José Ricardo G. Magalhães pela parceria no desenvolvimento do dispositivo coletor aeromicrobiano.

Aos meus colegas de turma (Layanna, Cleilton, Fernando, Cristiane e Mileide), especialmente Layanna e Cleilton pela amizade e apoio.

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para execução desse trabalho.

**AGRADEÇO**

# ÍNDICE

1	<b>CAPÍTULO 1:</b> .....	11
	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
2	<b>CAPÍTULO 2:</b> .....	23
	<b>Amostragem aerobiológica de <i>Aspergillus welwitschiae</i> coletados com Vant (1-100 m de altura) no semiárido da Bahia, Brasil</b> .....	23
	<b>Abstract</b> .....	24
2.1	<b>Introdução</b> .....	26
2.2	<b>Materiais e Métodos</b> .....	29
2.2.1	Área de estudo.....	29
2.2.2	Coletor aeromicrobiano.....	30
2.2.3	Aquisição de dados aeromicrobianos e climáticos.....	32
2.2.4	Isolamento e Identificação Morfológica dos Fungos.....	34
2.2.5	Teste de patogenicidade.....	35
2.3	<b>Resultados e Discussões</b> .....	35
2.3.1	Associações na SBL.....	37
2.3.2	Associações na PBL.....	38
2.3.3	Associações com a Umidade Relativa do Ar.....	40
2.3.4	Teste de Patogenicidade.....	41
2.4	<b>Conclusões</b> .....	42
	<b>Referências</b> .....	43
	<b>ANEXO:</b> Relatório descritivo do Dispositivo coletor aeromicrobiano acoplável em aeronave remotamente pilotada .....	47

## RESUMO

BARROS, M.M.G. **Amostragem aerobiológica de *Aspergillus welwitschiae* coletados com Vant (1-100 m de altura) no semiárido da Bahia, Brasil.** Cruz das Almas / BA, 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma planta suculenta monocotiledônea perene da família *Asparagaceae* adaptada a regiões áridas e semiáridas. O Brasil é o maior produtor mundial de sisal, com 80 mil toneladas de fibra produzidas em 2018, e o estado da Bahia é responsável por mais de 95% dessa produção. Entretanto, o sisal vem sendo acometido pela podridão vermelha, causada pelo fungo saprofítico oportunista *Aspergillus welwitschiae*. Este fungo infecta o caule e causa a destruição das células do tecido parenquimático e do cilindro vascular, levando a necrose dos tecidos. A principal fonte de esporos fúngicos para a atmosfera são os substratos nos quais os fungos crescem, como plantas, solo e matéria orgânica em decomposição. A dispersão aérea de microrganismos envolve duas camadas atmosféricas: a camada limite de superfície (SBL) e a camada limite planetária (PBL). A SBL se refere à camada em que a dispersão ocorre em alturas abaixo de 50 m e a PBL representa a zona de disseminação em escala continental (acima de 50 m). Com o objetivo de analisar a dispersão aérea de *A. welwitschiae* em municípios produtores de sisal na Bahia, placas de Petri com meio Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido com antibiótico foram colocadas em um dispositivo coletor microbiano acoplado a um Vant. O dispositivo compreende um conjunto de articuladores mecânicos, motores e sensores eletrônicos e fotossensíveis que permitiram a abertura e o fechamento das placas de petri remotamente e nas alturas específicas de amostragem. Para o controle dos processos de abertura e fechamento das placas de petri, usamos o controle do próprio Vant (Drone do modelo phantom 4 advanced) que é responsável por enviar o comando do sinal luminoso ao sensor fotossensível acoplado ao vant. A partir disso, a informação eletrônica é transmitida ao servo motor que é responsável por permitir de forma mecânica a abertura e fechamento das placas de petri. Para as coletas georreferenciadas, foram utilizados os aplicativos Pix 4D Capture e Dronedeploy para o controle dos aerolevantamentos. Sendo assim, em épocas distintas foram

realizados voos sistemáticos, em diferentes altitudes, em três áreas de produtores de sisal na Bahia. As culturas foram incubadas, as colônias que cresceram foram purificadas, preservadas e analisadas quanto as características morfológicas macro e microscópicas. Foram encontrados esporos de *A. welwitschiae* no ar e a quantidade de esporos variou nas camadas atmosféricas, sendo maior na SBL, o que pode estar relacionado à dispersão dos esporos por pequenas distâncias. Os isolados encontrados na PBL podem estar relacionados à dispersão do fungo horizontalmente por maiores distâncias e esse transporte sofre grande influência de fatores climáticos. O maior entendimento dos aspectos que controlam o transporte e deposição de esporos fúngicos de *A. welwitschiae* pelo ar pode ajudar na compreensão de aspectos epidemiológicos da podridão vermelha no sisal.

**Palavras-chave:** Camadas atmosféricas, Drone, Esporos fúngicos, Patógeno

## ABSTRACT

BARROS, M.M.G. **Amostragem aerobiológica de *Aspergillus welwitschiae* coletados com Vant (1-100 m de altura) no semiárido da Bahia, Brasil.** Cruz das Almas / BA, 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Sisal (*Agave sisalana* Perrine) is a perennial monocotyledon succulent plant in the *Asparagaceae* family adapted to arid and semi-arid regions. Brazil is the world's largest producer of sisal, with 80 thousand tons of fiber produced in 2018, and the state of Bahia is responsible for more than 95% of this production. However, sisal has been affected by red rot, caused by the opportunistic saprophytic fungus *Aspergillus welwitschiae*. This fungus infects the stem and causes the destruction of the cells of the parenchymal tissue and the vascular cylinder, leading to tissue necrosis. The main source of fungal spores in the atmosphere are the substrates on which fungi grow, such as plants, soil and decomposing organic matter. Aerial dispersion of microorganisms involves two atmospheric layers: the surface boundary layer (SBL) and the planetary boundary layer (PBL). The SBL refers to the layer in which the dispersion occurs at heights below 50 m and the PBL represents the dissemination zone on a continental scale (above 50 m). In order to analyze the aerial dispersion of *A. welwitschiae* in municipalities producing sisal in Bahia, Petri dishes with Potato Dextrose Agar (BDA) medium added with antibiotics were placed in a microbial collection device coupled to a UAV. The device comprises a set of mechanical articulators, motors and electronic and photosensitive sensors that allowed the opening and closing of petri dishes remotely and at specific sampling times. For the control of the opening and closing processes of the petri dishes, we use the control of the Vant itself (Drone of the phantom 4 advanced model) which is responsible for sending the command of the light signal to the photosensitive sensor coupled to the vant. From this, the electronic information is transmitted to the servo motor, which is responsible for mechanically allowing the opening and closing of the petri dishes. For the georeferenced collections, the Pix 4D Capture and Dronedeploy applications were used to control the aerial surveys. Therefore, at different times,

systematic flights were carried out, at different altitudes, in three areas of sisal producers in Bahia. The cultures were incubated, the colonies that grew were purified, preserved and analyzed for macro and microscopic morphological characteristics. Spores of *A. welwitschiae* were found in the air and the amount of spores varied in the atmospheric layers, being higher in SBL, which may be related to the dispersion of spores over small distances. The isolates found in the PBL may be related to the spread of the fungus horizontally over greater distances and this transport is strongly influenced by climatic factors. The greater understanding of the aspects that control the transport and deposition of fungal spores of *A. welwitschiae* by air can help in the understanding of epidemiological aspects of red rot in sisal.

**Keywords:** Atmospheric layers, Drone, Fungal spores, Pathogen

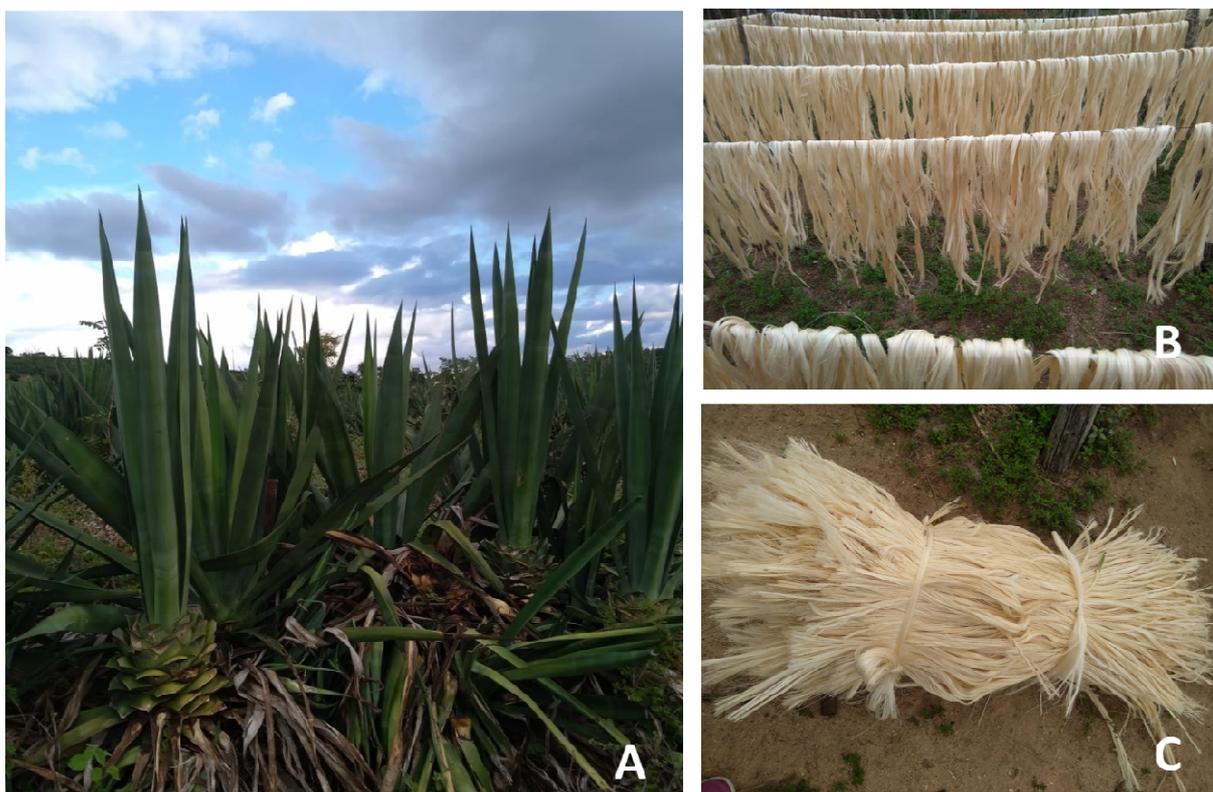
---

**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO DE LITERATURA**

---

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma planta suculenta monocotiledônea perene, da família *Asparagaceae*, com origem nas regiões áridas e semiáridas do México (Medina, 1954; Coleman-Derr, 2016), e foi introduzido na Caatinga Brasileira em 1903, por bulbilhos vindos da Flórida / Estados Unidos, mas os plantios para a produção comercial da fibra só se estabeleceram algumas décadas depois no semiárido Baiano (Figura 1).

O Brasil é o maior produtor de sisal do mundo, com produção média anual de 80 mil toneladas de fibras, o que representa 60% de toda produção mundial. O estado da Bahia é o responsável por cerca de 93% da produção nacional, seguido do estado da Paraíba (4%) e Rio Grande do Norte (3%). Do que é produzido aqui no Brasil, 85% é exportado para os Estados Unidos (69,7%) e China (11,2%) (Sindifibras, 2019).



**Figura 1.** Plantio de sisal (*Agave sisalana* Perrine) na Bahia (A) e Fibras de sisal (B e C).

Fonte: Barros, M.M.G

No Estado da Bahia, o cultivo do sisal se expandiu rapidamente, tornando-se uma das principais fontes de emprego e renda para uma grande parte da população rural da região sisaleira. Essa cultura gera empregos, por meio de uma

cadeia de serviços que abrange desde os trabalhos de manutenção das lavouras (baseados na mão de obra familiar e técnicas tradicionais de cultivo), extração e processamento da fibra para o beneficiamento, até as atividades de industrialização de diversos produtos (Abraham et al., 2016; Davis, 2018)

O sisal possui várias características morfológicas e fisiológicas que o tornam bem adaptado ao clima semiárido do bioma Caatinga (Mielenz et al., 2015). Como outras espécies de *Agave*, a planta tem o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) que permite a fixação do CO<sub>2</sub>, com abertura estomática durante a noite, para diminuir a evapotranspiração (Davis, 2018). Além disso, as folhas têm uma cutícula carnosa, convexa e espessa, e são dispostas em espiral em torno do caule, formando uma roseta, fato que favorece a retenção de água (Figura 1A) (Medina, 1954; Ortiz e Van der Meer, 2006; Mielenz et al., 2015).

A podridão vermelha do sisal é o principal problema fitossanitário em plantações de sisal no Brasil, sendo causada pelo fungo saprofítico e oportunista *Aspergillus welwitschiae* (Figura 2D) (Duarte et al., 2018). Esse fungo penetra em tecido caulinar injuriado do hospedeiro, a partir de lesões de origem mecânica ou fisiológica (Lima et al., 1998; Coutinho, 2006) e causa a destruição das células do tecido parenquimático e do cilindro vascular, levando a necrose dos tecidos internos do caule, se comportando como um patógeno necrotrófico (Duarte et al., 2018). Os tecidos internos afetados apresentam coloração avermelhada ou parda, característica que dá o nome à doença, e externamente as folhas de uma planta doente adquirem uma coloração amarelada e murcham (Figuras 2A, 2B, 2C) (Coutinho, 2006; Massi, 2016; Duarte et al., 2018).

De acordo com Abreu 2010, essa doença encontra-se disseminada em quase todos os plantios da região sisaleira, com prevalência de 100% nos municípios estudados e incidência variando entre 5 e 43,66% (Silva et al. 2009; Abreu, 2010). Não existe um controle curativo para a podridão vermelha do sisal. A falta de conhecimento técnico e um manejo inadequado aumentam a disseminação e a propagação da doença. Algumas medidas preventivas tem sido sugeridas para o controle da doença, como arrancar e queimar plantas sintomáticas, utilização de rebentos proveniente de campos saudios para uso em novos campos, desinfestação de ferramentas de campo, uso de resíduos de

desfibramento como adubação orgânica, a fim de melhorar a fertilidade do solo (Silva et al., 2008; Batista et al., 2010).



**Figura 2.** Plantas de sisal no campo apresentando murcha e amarelecimento das folhas relativos à podridão vermelha (A), Sintomas da doença da podridão vermelha nos tecidos internos do caule em planta adulta de sisal no campo (B e C), Estruturas micromorfológicas do *Aspergillus welwitschiae* (Conidióforos, Vesículas, Fiáldes e conídios) (D). Fonte: Barros, M.M.G.

Por ser um fungo saprófito e necrotrófico, seu ciclo de vida continua sobre a planta morta, nos restos da cultura no solo. O micélio do *A. welwitschiae* continua a colonizar os tecidos mortos e, por sua vez, produz esporos enquanto existir nutrientes (Kucharek, 2005; Massi, 2016).

Esporos fúngicos provenientes de diversos ambientes estão amplamente presentes e metabolicamente ativos na atmosfera e tem sua dispersão através dos ventos, podendo ser dispersos por vastas áreas, levando os patógenos a múltiplos locais de deposição (Barberan et al., 2015; Hayashida and Kojima, 2015). A pesquisa aerobiológica, dentre outros objetivos, busca identificar e quantificar esporos fúngicos no ar. As principais fontes de emissão de esporos na atmosfera são os substratos nos quais os fungos crescem, a exemplo de plantas, solo e matéria orgânica em decomposição. Isso significa que a maioria dos esporos de fungos fitopatogênicos aéreos são originários de fazendas com culturas infestadas, do solo, da decomposição de materiais orgânicos, áreas florestais e espaços verdes em geral, e devido ao pequeno diâmetro de seus esporos, a propagação e dispersão de fungos pelo vento ocorre facilmente (Grinn-Gofroń, 2011).

A dispersão aérea envolve duas camadas atmosféricas: a camada limite de superfície (*Surface boundary layer* - SBL) e a camada limite planetária (*Planetary boundary layer* - PBL) (Oke, 1987) (Figura 3). A SBL se refere a camada atmosférica inferior a 50 metros de altura, na qual os esporos, ao serem liberados de uma fonte conhecida ou desconhecida, se alastram por pequenas distâncias em correntes de ar. Na PBL, os componentes importantes que comprometem a dispersão e sobrevivência dos esporos nessa escala incluem os ventos, chuva, temperatura e radiação UV. Uma vez que atinjam a altura de 50 metros ou mais, os ventos podem dispersar esses esporos a grandes distâncias, disseminando um patógeno ao longo de milhares de metros (Aylor, 2003; Schmale & Ross, 2015).

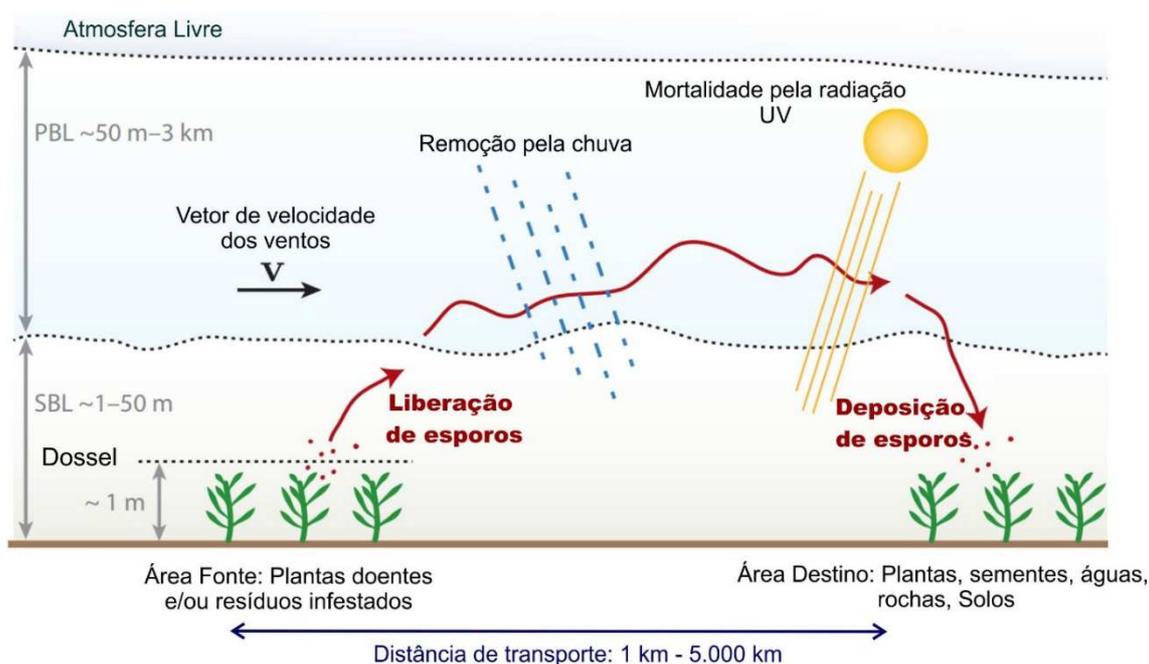
Dentro dessas camadas, a dispersão de microrganismos pela atmosfera envolve três processos relacionados ao movimento das partículas: na SBL ocorre a liberação e deposição e na PBL ocorre a deriva (Schmale & Ross, 2015). A liberação dos esporos de *Aspergillus* na atmosfera acontece por liberação passiva e, por serem hidrofóbicos, seu transporte vertical acontece através de turbulências atmosféricas ou gotas de chuva (umidade) (Zeng, 2015; Pakpour, De-Wei, & Klironomos, 2015). A deriva está associada ao movimento passivo e direcionado do patógeno através dos fluxos de ar e, horizontalmente, esses esporos podem ser transportados por milhares de quilômetros, sendo possível

dispersar um patógeno para novas áreas. A deposição se refere ao pouso em um novo local, podendo conter um hospedeiro viável (Schmale & Ross, 2015).

Estudos indicam os ventos, temperatura, radiação UV e a umidade como sendo os fatores climáticos mais decisivos sobre o transporte, deriva e pouso dos esporos, e são os responsáveis por mediar essa dispersão (Figura 3) (Velez-Pereira, A.M., Linares, Delgado & Belmonte, 2016; Zhang et al., 2017).

A propagação de doenças na SBL acontece através de um foco. Um foco de infecção é uma área, por exemplo de colheita, com propágulos do patógeno e pode acontecer em distâncias curtas através da difusão focal, bem como em longas distâncias através do aumento da difusão focal em focos secundários e terciários (Nagarajan, 1990; McCartney et. al. 2006; Yates, 2016).

Na PBL, a dispersão a longa distância ocorre quando o patógeno é transportado pelos ventos de forma passiva, sendo capaz de causar infecção em outra localidade. Nessa dispersão, os esporos ficam mais vulneráveis a danos ambientais durante o percurso e os componentes importantes nessa escala que promovem ou dificultam a sobrevivência dos esporos incluem os ventos, chuva e temperatura. As condições de umidade do ambiente podem interferir na viabilidade ou infectividade dos esporos de espécies patogênicas ou arrastar esses esporos de volta para o solo (Nagarajan, 1990; Yates, 2016).



Fi

**gura 3:** Processos de liberação, transporte e deposição de esporos fúngicos através das camadas atmosféricas SBL e PBL. Fonte: Imagem adaptada de Schmale & Ross, 2015.

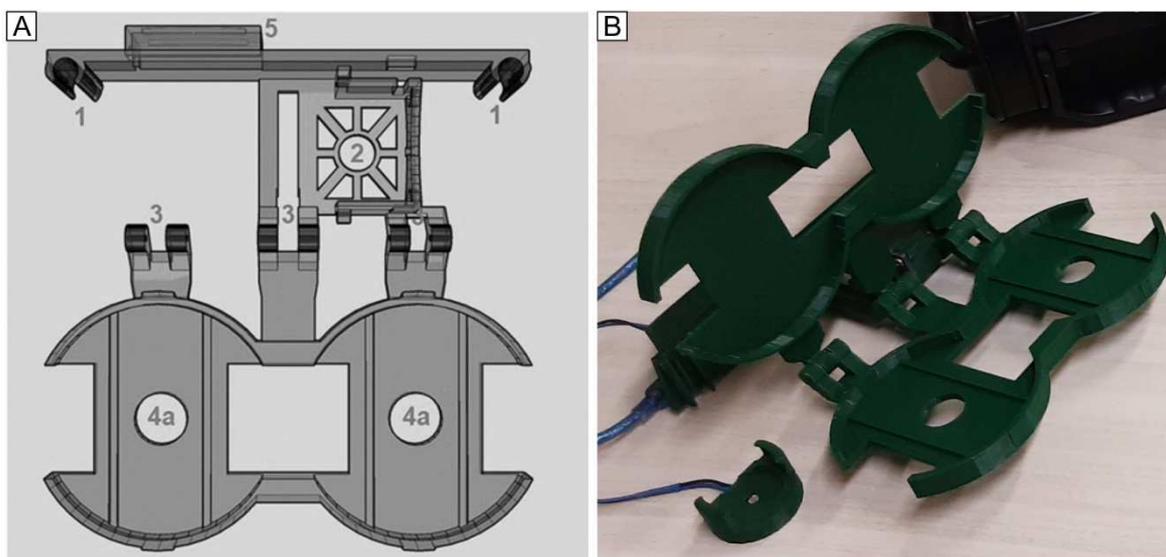
Em geral, os esporos da maioria dos patógenos fúngicos são disseminados pelo ar. A amostragem do ar pode ser uma ferramenta valiosa no manejo de doenças de plantas, pois este requer uma compreensão da dispersão aérea desses inóculos (Kucharek, 2005; Barberan et al., 2015; Zhang et al., 2017).

Em parceria com o grupo de tecnologias educacionais, robótica e física (G-TERF), da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, para esse trabalho foi desenvolvido e patenteado um coletor aeromicrobiano acoplável em aeronave remotamente pilotada (ARP) (número de registro: BR1020190139030). O coletor foi projetado para ser acoplado em aeronaves remotamente pilotadas (UAV) nos modelos de quadricópteros da série Phantom 4 da Dà-Jiāng Innovations (Shenzhen DJI Sciences and Technologies Ltd) permitindo realizar investigações de atividades microbianas entre as alturas de 1 até 120 metros, em relação ao ponto de decolagem no solo, que são altitudes permitidas e regulamentadas no Brasil pela ICA 100-40 (Instituto de Cartografia Aeronáutica) do Departamento de controle do espaço aéreo brasileiro.

O dispositivo foi desenvolvido com objetivos voltados para a inovação científica e tecnológica nas áreas da engenharia, robótica e física aplicadas à

área agrícola, especificamente à fitopatologia e microbiologia agrícola. A elaboração do seu design ocorreu em ambiente computacional, com impressão 3D. O dispositivo compreende um conjunto de articuladores mecânicos, motores, sensores eletrônicos e fotossensíveis que permitiram a abertura e o fechamento das placas de petri remotamente em alturas específicas (Figura 4). Para o controle dos processos de abertura e fechamento das placas de petri, usamos o controle do próprio Vant que envia um comando ao sensor fotossensível acoplado ao Vant. A partir disso, a informação eletrônica é transmitida ao servo motor que é responsável por permitir de forma mecânica a abertura e fechamento das placas de petri. Para as coletas georreferenciadas, foram utilizados os aplicativos Pix 4D Capture e Dronedeploy para o controle dos aerolevamentos.

Na figura 4 podem ser identificados: base de acoplamento ao trem de pouso da ARP (1); mesa de servo (2) onde é acoplado o servo-motor que atua mecanicamente sobre a tampa; sistema de articulação entre as peças (3); suportes para acoplamento das placas de Petri (4a) e para a placa microcontroladora eletrônica (5).



**Figura 4.** Vista superior do protótipo do coletor aeromicrobiano acoplável em aeronave remotamente pilotada com estruturas numeradas (A) Coletor aeromicrobiano (B). Fonte: Fonte: Barros, M.M.G, 2019.

Mais especificamente, o coletor possui aplicação e uso para: I) monitoramento da qualidade microbiológica do ar e seus impactos na saúde

animal e vegetal; II) monitoramento da dispersão vertical e horizontal de microrganismos benéficos e patogênicos aplicados aos setores da agropecuária e saúde humana e III) coleta de microrganismos aéreos e investigação de sua diversidade taxonômica. Além disso, destacamos que o método de coleta proporcionado pela invenção, bem como, o dito dispositivo, é dotado de atividade inventiva de baixo custo e de fácil operação, sendo, portanto, uma grande vantagem para a aplicação industrial e fácil comercialização.

## REFERÊNCIAS

Abraham, P. E., Yin, H., Borland, A. M., Weighill, D., Lim, S. D., De Paoli, H. C., et al. (2016). Transcript, protein, and metabolite temporal dynamics in the CAM plant *Agave*. *Nat. Plants* 2:16178

Abreu, K. C. L. M. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia. 2010. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2010.

Aylor DE. (2003). Spread of plant disease on a continental scale: role of aerial dispersal of pathogens. *Ecology*, 84, 1989–97

Barberan, A., Ladau, J., Leff, J.W., Pollard, K.S., Menninger, H.L., Dunn, R.R. & Fierer, N. (2015). Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi. *Academy of Sciences*, 112(18), 5756–5761.

Batista, D.C.; Silva, F.M.; Souza, W.C.O.; Barbosa, M.A.G.; Costa, V.S.O.; BRANDÃO, W.N. TERAQ, D. Manejo da Podridão Vermelha do Tronco do Sisal. Embrapa, Circular Técnica, Petrolina, n. 92, Dez. 2010.

Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., et al. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*. 209, 798–811

Coutinho, W. M.; LUZ, C. M.; Suassuna, N. D.; Silva, O. R.R. F.; Suinaga, F. A. A podridão do tronco do sisal. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006a. 4 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 281)

Coutinho, W.M.; Suassuna, N.D.; LUZ, C.H.; Suinaga, F.A.; Silva, O.R.R.F. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, n. 6, p. 605, 2006.

Davis, S. C., Simpson, J., Gil Vega, K. D. C., Niechayev, N. A., van Tongerlo, E., Castano, N. H., ... Búrquez, A. (2019). *Undervalued potential of crassulacean acid metabolism (CAM) for current and future agricultural production. Journal of Experimental Botany.*

Duarte, E. A. A., Damasceno, C. L., de Oliveira, T. A. S., Barbosa, L. de O., Martins, F. M., de Queiroz Silva, J. R., ... Soares, A. C. F. (2018). *Putting the Mess in Order: Aspergillus welwitschiae (and Not A. niger) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. Frontiers in Microbiology, 9.*

Grinn-Gofroń A, Strzelczak A (2011) The effects of meteorological factors on the occurrence of Ganoderma sp. spores in the air. *Int J Biometeorol* 55(2), 235–241

Grinn-Gofroń, A., Nowosad, J., Bosiacka, B., Camacho, I., Pashley, C., Belmonte, J., Damialis, A. (2019). *Airborne Alternaria and Cladosporium fungal spores in Europe: Forecasting possibilities and relationships with meteorological parameters. Science of The Total Environment, 653, 938–946.*

Hayashida, R., Kojima, T. (2015). Measurement of living airborne microbes using sheet type Aerobic count plates. *Earozoru Kenkyu, 30, 198-206.*

Kucharek, T. Disease Control Program for peanuts extension Plant Pathology Report n. 12, Gainesville, Florida January, 2005, (Revision n.24)

Lima, E.F.; Moreira, J. de A.N.; Batista, F.A.S.; Silva, O.R.R.F.da; Farias, F.J.C.; Araújo, A.E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. Revista de Oleaginosas e Fibrosas, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

Massi, F. P., Sartori, D., de Souza Ferranti, L., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Vieira, M. L., et al. (2016). Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and . *Int. J. Food Microbiol.* 221, 19–28.

Mccartney. H.A.; Fitt, B.D.L. West, J.S. Dispersal of foliar plant pathogens: mechanisms, gradients and spatial patterns, chapter 6, p 159-186. In: COOKE, B. K.; JONES, D. G.; KAYE, B., The epidemiology of plant diseases, 2nd edition, Springer, Netherlands, 2006, 575 p.

Medina, J. C. O Sisal. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, 1954, 286p.

Mielenz, J. R., Rodriguez, M. Jr., Thompson, O. A., Yang, X., and Yin, H. (2015). Development of *Agave* as a dedicated biomass source: production of biofuels from whole plants. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1–13.

Nagarajan S, Singh DV. 1990. Long-distance dispersion of rust pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28:139–153.

Oke TR. (1987). *Boundary Layer Climates*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 2nd ed.

Ortiz, D. G., and Van der Meer, P. (2006). Claves de las especies del género *Agave*, L. cultivadas como ornamentales en la Península Ibérica e Islas Baleares. Keys to the *Agave*, L. species cultivated as ornamental in Spain. *Acta Bot. Barc.* 50, 441–457

Pakpour, S., De-Wei, L., & Klironomos, J. (2015). Relationships of fungal spore concentrations in the air and meteorological factors. *Fungal Ecology*, 13, 130–134.

Schmale, D. G., & Ross, S. D. (2015). Highways in the Sky: Scales of Atmospheric Transport of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 591–611.

Silva, F. M. ; Brandao, W. N. ; Barbosa, M. A. G. ; Terao, D. ; Batista, D. C. . Levantamento e Distribuição Espacial da Podridão Vermelha do Sisal em Áreas de Produção da Bahia. In: IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido, 2009, Petrolina. Anais da IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido. Petrolina: Embrapa 371 Semiárido, 2009. p. 122-128.

Silva, O. R. R. F. DA; coutinho, W.M.; Cartaxo, W.V.; Sofiatti, V. Silva Filho, J.L.; Carvalho, O.S.; Costa, L. B. da Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro, Circular Técnica n. 123, Embrapa, Campina Grande, PB, julho, 2008.

Sindifibras. 2019. In: Câmara Setoriais de Fibras Naturais – CSFN / MAPA 21ª Reunião Ordinária – 20/03/2019. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/fibras-naturais/2019/21a-ro/diagnostico-setor-fibras\\_20-marco-2019\\_final-convertido.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/fibras-naturais/2019/21a-ro/diagnostico-setor-fibras_20-marco-2019_final-convertido.pdf) Acesso em: 04 dez. 2020.

Velez-Pereira, A.M., De Linares, C., Delgado, R. & Belmonte, J. (2016). Temporal trends of the airborne fungal spores in Catalonia (NE Spain), 1995-2013. *Aerobiologia*, 31(1), 23-37.

Wallace, G. B., and Dieckmahns, E. C. (1952). Bole rot in sisal. *East African Agricultural. For. J.* 18, 24–29. doi: 10.1080/03670074.1952.116 64819

Yates, V.M., Nakatsu, H.C., Miller, V.R., Pillai, D.S., *Manual of Environmental Microbiology*. 4<sup>th</sup> edition. Washington, DC: ASM press, 2016.

Zeng X, Wei S, Sun L, Jacques D a., Tang J, Lian M, Ji Z, Wang J, Zhu J, Xu Z. 2015. Bioremediation of heavy metals from contaminated sediments by the *Aspergillus niger* strain SY1. *J Soils Sediments* 15:1029–1038.

Zhang, D., Murata, K., Hu, W., Yuan, H., Li, W., Matsusaki, H. & Kakikawa, M. (2017). Concentration and viability of bacterial aerosols associated with weather in Asian continental outflow: current understanding. *Aerosol Science and Engineering*, 1(2), 66-77.

---

## **CAPÍTULO 2**

**AMOSTRAGEM AEROBIOLÓGICA DE *Aspergillus welwitschiae*  
COLETADOS COM VANT (1-100 M DE ALTURA) NO SEMIÁRIDO  
DA BAHIA, BRASIL**

---

Artigo no formato da revista Aerobiology

## AMOSTRAGEM AEROBIOLÓGICA DE *Aspergillus welwitschiae* COLETADOS COM VANT (1-100 M DE ALTURA) NO SEMIÁRIDO DA BAHIA, BRASIL

<sup>a</sup>BARROS, M.M.G; <sup>b</sup>MAGALHÃES, J.R.G; <sup>a</sup>BEZERRA, J.L; <sup>b</sup>PEREIRA, W.S.,  
<sup>a</sup>SOARES, A. C. F

<sup>a</sup>Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCAAB-UFRB), Cruz das Almas, BA.

<sup>b</sup>Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC- UFRB), Cruz das Almas, BA, 44380, Brasil

Autor para correspondência: Ana Cristina Fermino Soares, [acsoares@ufrb.edu.br](mailto:acsoares@ufrb.edu.br)

### RESUMO

A região sisaleira está localizada no semiárido Baiano e recebe essa denominação devido a tradicional cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine), a extração de suas fibras gera renda e empregos. O sisal vem sendo acometido pela podridão vermelha, doença causada pelo fungo oportunista *Aspergillus welwitschiae*, que leva à destruição as células do tecido parenquimático e do cilindro vascular e morte da planta. Objetivando analisar a ocorrência de *A. welwitschiae* em diferentes altitudes, duas placas de Petri com meio BDA foram colocadas em um dispositivo coletor aeromicrobiano acoplado em um Vant multirrotor. Em épocas diferentes, foram realizadas coletas em três fazendas da região sisaleira. Após incubação e purificação os isolados foram identificados com técnicas de morfologia. O número de colônias de *A. welwitschiae* sofre interferência da altitude e umidade, sendo maior nas alturas próximo ao solo, sugerindo que o foco de contaminação por *A. welwitschiae* ocorre dentro das fazendas produtoras. Os isolados causaram sintomas de podridão vermelha em mudas de sisal em condições de casa de vegetação. Este estudo relata pela primeira vez a ocorrência de *A. welwitschiae* no ar em altitudes variando de 1 a 100 m.

**Palavras-chave:** *Agave sisalana* Perrine; Camadas atmosféricas; Drone; Fungos aéreos; Transporte de esporos

## ABSTRACT

The sisaleira region is located in the semi-arid region of Bahia and receives this name due to the traditional culture of sisal (*Agave sisalana* Perrine), the extraction of its fibers generates income and jobs. Sisal has been affected by red rot, a disease caused by the opportunistic fungus *Aspergillus welwitschiae*, which leads to the destruction of the cells of the parenchymal tissue and the vascular cylinder and death of the plant. In order to analyze the occurrence of *A. welwitschiae* at different altitudes, two Petri dishes with BDA medium were placed in an aeromicrobial collecting device coupled to a multicopter Vant. At different times, collections were made at three farms in the sisal region. The plates were incubated and the colonies of fungi were purified and identified with morphology techniques. The number of colonies of *A. welwitschiae* varied in the atmospheric layers and was higher in the boundary surface layer (SBL) (19 colonies in the first collection and seven colonies in the second collection) compared to the planetary boundary layer (PBL) (eight colonies in the first collection and two colonies in the second collection), suggesting that the focus of contamination by *A. welwitschiae* occurs within the producing farms. PBL isolates are related to the spread of the fungus between farms. Moisture acts by dragging spores to soil through raindrops. *A. welwitschiae* isolates caused symptoms of red rot in sisal seedlings under greenhouse conditions. This study reports for the first time the occurrence of *A. welwitschiae* in the air at altitudes ranging from 1 to 100 m.

**Keywords:** *Agave sisalana* Perrine; Atmospheric Layers; Drone; Aerial Fungi; Spore Transportation

## 2.1 Introdução

O sisal é conhecido pela exploração de suas fibras, com principal aplicação econômica na indústria têxtil, sendo o Brasil o maior produtor de sisal do mundo, uma média de 80 mil toneladas, e o maior exportador mundial (cerca de 85% de sua produção). O estado da Bahia é o responsável por cerca de 93% da produção nacional, seguido do estado da Paraíba (4%) e Rio Grande do Norte (3%) (Rousso, 2010; Silva, 2016; Sindifibras, 2019). Esta cultura é social e economicamente importante na região semiárida do Brasil por gerar renda e empregos em sua cadeia produtiva, sendo um produto de exportação (Silva, 2016). Sua fibra pode ser utilizada na produção de cordas, artesanato, papel kraft, tapetes, podendo também ser utilizada na construção civil e na indústria por seus produtos serem biodegradáveis, recicláveis e com pouca demanda por agrotóxicos e fertilizantes, seu plantio tem pouco impacto, o que também é benéfico ao meio ambiente (Moreira et al., 1996; Martins et al., 2009).

O sisal vem sendo acometido pela doença da podridão vermelha, causada por um habitante comum do solo, o fungo saprofítico e oportunista *Aspergillus welwitschiae* (Massi, 2016; Duarte et al., 2018). Este fungo infecta o caule e a base das folhas de sisal, causando a destruição das células do tecido parenquimático e do cilindro vascular, levando a necrose dos tecidos internos do caule, se comportando como um patógeno necrotrófico. Os tecidos afetados apresentam coloração avermelhada ou parda, característica histopatológica que dá o nome à doença (Duarte et al., 2018).

Nesse âmbito, a pesquisa aerobiológica busca capturar, identificar e quantificar os esporos fúngicos no ar, com foco no patógeno, em plantios de sisal, para a melhor compreensão da dispersão deste fungo. Historicamente, as pesquisas transcorrem com foco na liberação e deposição de microrganismos, e pouca ênfase é dada para o transporte horizontal. (Schmale & Ross, 2015).

Esporos fúngicos podem ser liberados no ar, a partir de uma ampla variedade de substratos, sendo originários principalmente dos restos de plantas doentes no solo, transporte de folhas infectadas ou solo contaminado (Hayashida & Kojima, 2015). As estruturas de fungos pequenas o suficiente para serem carregadas pelo ar são representadas por esporos, hifas e micélios (Almaguer-Chávez, 2018). Devido ao pequeno diâmetro dos esporos, quando esses interagem com um conjunto de condições climáticas do ambiente,

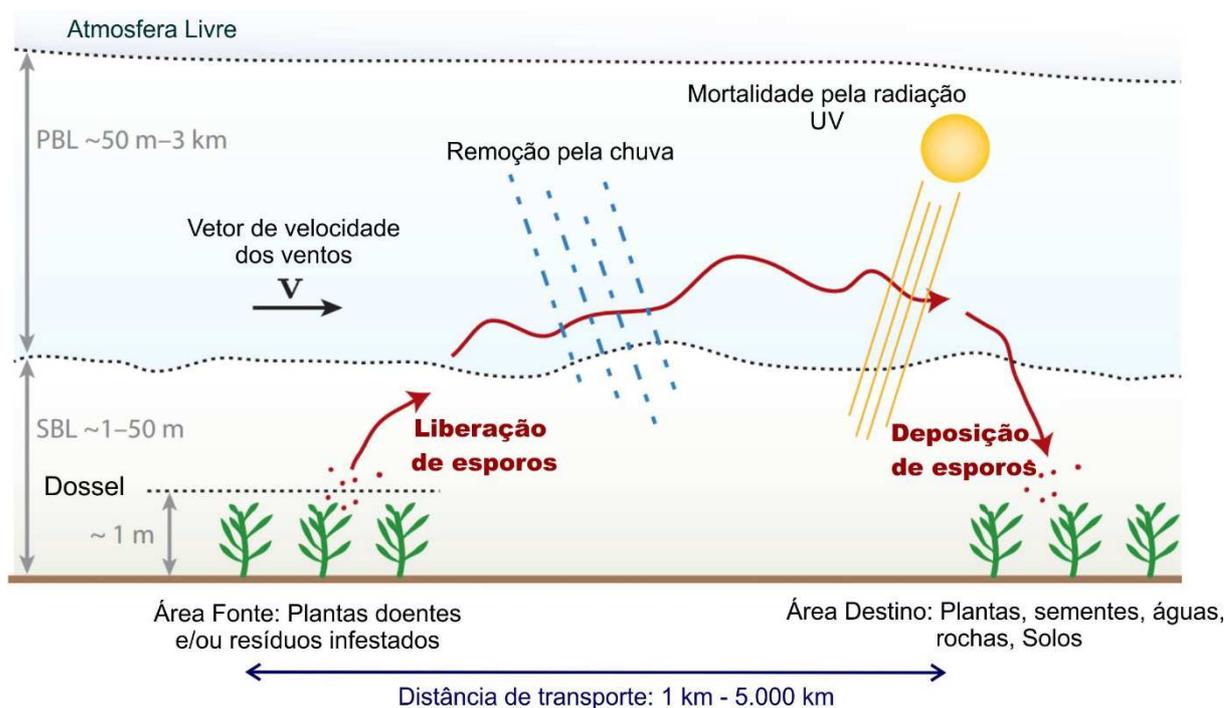
podem ser dispersos e transportados por longas distâncias no ar, levando, por exemplo, um patógeno a atingir múltiplos locais de infecção (Barberan et al., 2015).

A aerobiologia abrange o estudo de microrganismos transportados pelo ar, sejam eles vírus, bactérias ou fungos. O transporte de microrganismos pela atmosfera envolve três processos relacionados ao movimento das partículas: liberação (liberação e transporte vertical), deriva (transporte horizontal) e deposição (aterragem) (Schmale & Ross, 2015). A liberação dos esporos pode acontecer por dois mecanismos básicos: (1) descarga ativa de esporos e (2) liberação passiva de esporos. Os fungos com descarga ativa de esporos incluem fungos como *Sporobolomyces*, *Epicoccum*, *Nigrospora* e algumas leveduras. Muitos ascósporos e basidiósporos também possuem mecanismos de descarga ativos e sua liberação de esporos geralmente requer a absorção de umidade para aumentar a pressão da descarga. Fungos de esporos secos, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, geralmente são hidrofóbicos e seu transporte vertical acontece por força passiva, através de turbulências atmosféricas ou gotas de chuva (umidade) (Zeng, 2015; Tang et al., 2018).

A deriva está associada ao movimento horizontal passivo e direcionado do patógeno através dos fluxos de ar e a sobrevivência dos esporos durante o transporte é influenciado por condições ambientais e depende de vários fatores, incluindo a intensidade de luz ultravioleta, turbulências atmosféricas, padrões de vento, temperatura e umidade (Pakpour, De-Wei, & Klironomos, 2015; Velez-Pereira, A.M., Linares, Delgado & Belmonte, 2016; Zhang et al., 2017). Essas condições ambientais adversas tendem a diminuir o número de organismos viáveis durante o deslocamento, porém há variabilidade na sobrevivência entre grupos de microrganismos e dentro dos gêneros. Estudos com fluxos de ar indicam ainda um aumento na concentração e diversidade de esporos aéreos nas regiões a favor do vento (Alghamdi et al., 2014; Almaguer-Chávez 2018; Tang et al., 2018). Em geral, esporos fúngicos, alguns vírus e cistos amebianos são mais resistentes aos estresses ambientais encontrados durante o transporte aéreo horizontal (Priyamvada, 2017). A deposição refere-se ao pouso em um novo local, podendo encontrar um hospedeiro viável. Uma vez que os esporos de fungos encontrem um substrato ou hospedeiro adequado, sob condições ideais, o crescimento é iniciado (Schmale & Ross, 2015).

O movimento das partículas aeromicrobianas acontece em duas camadas atmosféricas: a camada limite de superfície (*Surface boundary layer* - SBL) e a camada limite planetária (*Planetary boundary layer* - PBL), conforme ilustrado na Figura 1 (Oke, 1987). A camada SBL se refere à camada atmosférica inferior a 50 metros, na qual os

esporos ao serem liberados de uma fonte conhecida ou desconhecida, se alastram em pequenas distâncias por correntes de ar. Na PBL, os componentes importantes que comprometem a deriva e sobrevivência dos esporos nessa escala incluem vento, chuva e temperatura. Uma vez que atinjam a altura de 50 metros, os ventos podem dispersar esses esporos a grandes distâncias, disseminando um patógeno ao longo de milhares de metros, através das fronteiras de fazendas, cidades e estados (Aylor, 2003; Schmale & Ross, 2015).



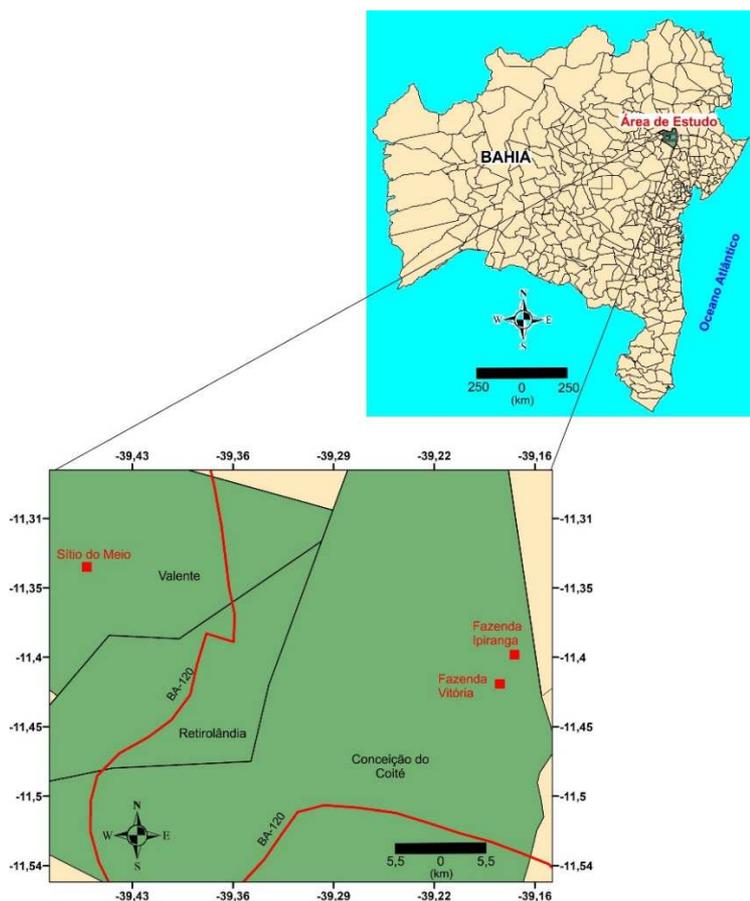
**Fig. 1:** Liberação, transporte e deposição de esporos fúngicos através das camadas atmosféricas SBL e PBL. Figura adaptada de Schmale & Ross, 2015

Sabe-se que o *Aspergillus* está entre os gêneros de fungos aerotransportados mais comuns, devido as características morfológicas de seus esporos (Zeng 2015; Woo, An, Xu, S.-M., & Yamamoto 2018) e desta forma, no presente trabalho investigamos a abundância de esporos aéreos de *A. welwitschiae* em três fazendas da região sisaleira mediante as seguintes hipóteses: 1) Os esporos aéreos de *A. welwitschiae* estão presentes no ar em plantios de sisal; 2) Os esporos de *A. welwitschiae* estão presentes em diferentes altitudes; 3) O número de esporos de *A. welwitschiae* no ar varia com a altitude; 4) O número de esporos de *A. welwitschiae* no ar varia com a época de amostragem.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Área de Estudo

A região de estudo abrange três fazendas da região sisaleira: Fazenda Vitória (Coordenadas UTM (Fuso 24S): Latitude: 8737574.22 m / Longitude: 480364.44 m), Fazenda Ipiranga (Coordenadas UTM (Fuso 24S): Latitude: 8739786.35 m / Longitude: 481454.01 m) e Sítio do meio (Coordenadas UTM (Fuso 24S): Latitude: 8746386.56 m / Longitude: 449805.80 m) (Fig.2). Levantamentos sistemáticos para captação de esporos fúngicos do ar, relativos as alturas de 1, 20, 30, 50 e 100 m, foram feitos em duas datas (16/08/2018 e 26/03/2019), nos mesmos horários de coleta para cada fazenda (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3).



**Fig. 2:** Mapa do estado da Bahia com a localização das três fazendas estudadas (quadrados vermelhos). Fazenda Ipiranga e Fazenda Vitória pertencentes ao município de Conceição do Coité e o Sítio do Meio pertencente ao Município de Valente.

**Tabela 1:** Dados de umidade relativa do ar da estação meteorológica de Serrinha/BA para os pontos de amostragem da Fazenda Vitória nos meses de agosto/2018 e março/2019.

Altura de coleta (m)	Horário da coleta (h)	Umidade Relativa do ar (%)	Umidade relativa do ar (%)
		16/agosto/2018	26/março/2019
1	18:05	62	80
20	16:30	33	72
30	16:45	51	76
50	17:50	56	78
100	18:05	62	80

**Tabela 2:** Dados de umidade relativa do ar da estação meteorológica de Serrinha/BA para os pontos de amostragem da Fazenda Ipiranga nos meses de agosto/2018 e março/2019.

Altura de coleta (m)	Horário da coleta (h)	Umidade Relativa do ar (%)	Umidade relativa do ar (%)
		16/agosto/2018	26/março/2019
1	11:03	43	54
20	09:50	36	52
30	10:30	54	63
50	10:45	45	55
100	11:03	43	54

**Tabela 3:** Dados de umidade relativa do ar da estação meteorológica de Serrinha/BA para os pontos de amostragem do Sítio do Meio nos meses de agosto/2018 e março/2019.

Altura de coleta (m)	Horário da coleta (h)	Umidade Relativa do ar (%)	Umidade relativa do ar (%)
		17/agosto/2018	27/março/2019
1	13:15	43	66
20	11:30	53	76
30	12:58	46	78
50	12:43	61	68
100	13:15	43	66

### 2.2.2 Coletor aeromicrobiano

Nesse estudo, para a coleta de esporos fúngicos no ar, um amostrador aerobiológico foi projetado, desenvolvido e patentado (BR1020190139030) em conjunto com o grupo de tecnologias educacionais, robótica e física (G-terf), do Centro de Ciências Exatas e

Tecnológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. O amostrador aerobiológico foi projetado para ser acoplado em aeronaves remotamente pilotadas (UAV) nos modelos de quadricópteros da série Phantom 4 da Dà-Jiāng Innovations (Shenzhen DJI Sciences and Technologies Ltd) (Fig.3). Desta forma, foi possível a coleta no ar, considerando o transporte atmosférico vertical e horizontal, e em altitudes específicas, fornecendo assim o conhecimento sobre a e disseminação do *A. welwitschiae* nas camadas SBL e PBL.

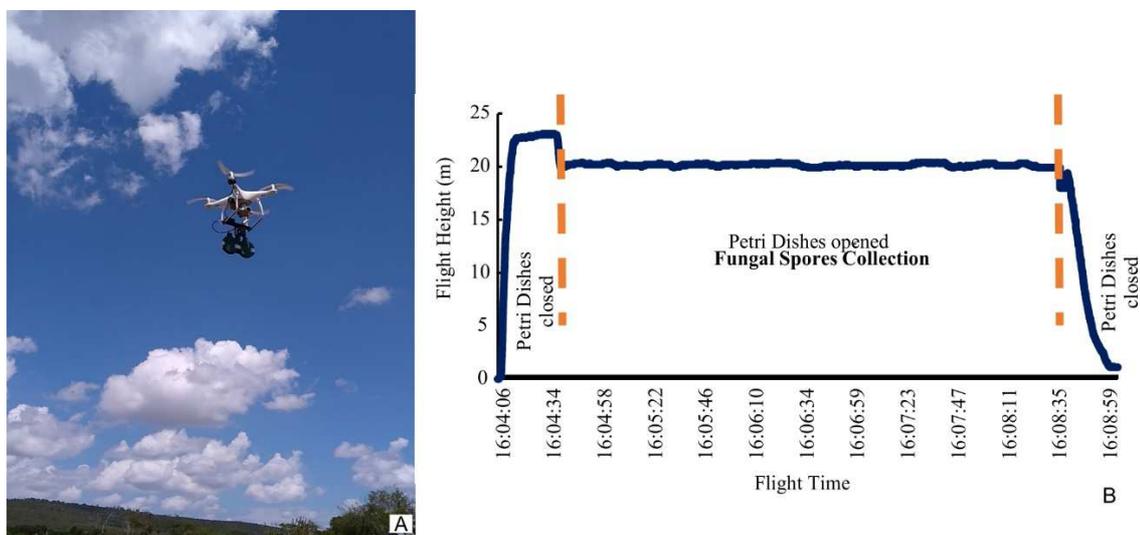
Destaca-se que não há no mercado nacional ou internacional produtos com as mesmas características do coletor aeromicrobiano: dispositivo portátil e de baixo custo, com eficiência para a coleta de microrganismos presentes no ar e acoplável em UAVs comerciais.



**Fig. 3:** Coletor aeromicrobiano desenvolvido em parceria com o grupo de tecnologias educacionais, robótica e física da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (G-TERF/UFRB), com duas placas de Petri descartáveis, medindo 9cm de diâmetro com meio de cultura e tampa encaixadas (A), VANT multirrotor modelo phantom 4 advanced (B) e Trabalho de campo de amostragem aerobiológica com o coletor aeromicrobiano acoplado ao VANT phantom 4 advanced (C).

### 2.2.3 Aquisição dos dados aeromicrobianos e climáticos

Para as alturas de 20, 30, 50 e 100 m, a amostragem de esporos fúngicos foi obtida por meio do coletor aeromicrobiano acoplado a um veículo aéreo não-tripulado Multirrotor, modelo Phantom 4 Advanced (Figs. 3A, 3B, 3C, 4A). No coletor, foram embarcadas duas placas de Petri com meio batata dextrose ágar (BDA) acrescido com 0,02 ml do antibiótico azitromicina. Para efetuar a amostragem dos esporos, as placas de Petri eram abertas, por controle remoto apenas durante a altura específica de cada voo, de modo que durante a decolagem, pouso e trajeto fora da altura específica as placas permaneciam fechadas (Fig. 4B). Os voos sistemáticos foram planejados e executados com uso do aplicativo *dronedeploy* e, para a orientação das linhas de voo, utilizou-se o aplicativo *UAV Forecast* que nos fornecia informações sobre a direção dos ventos.

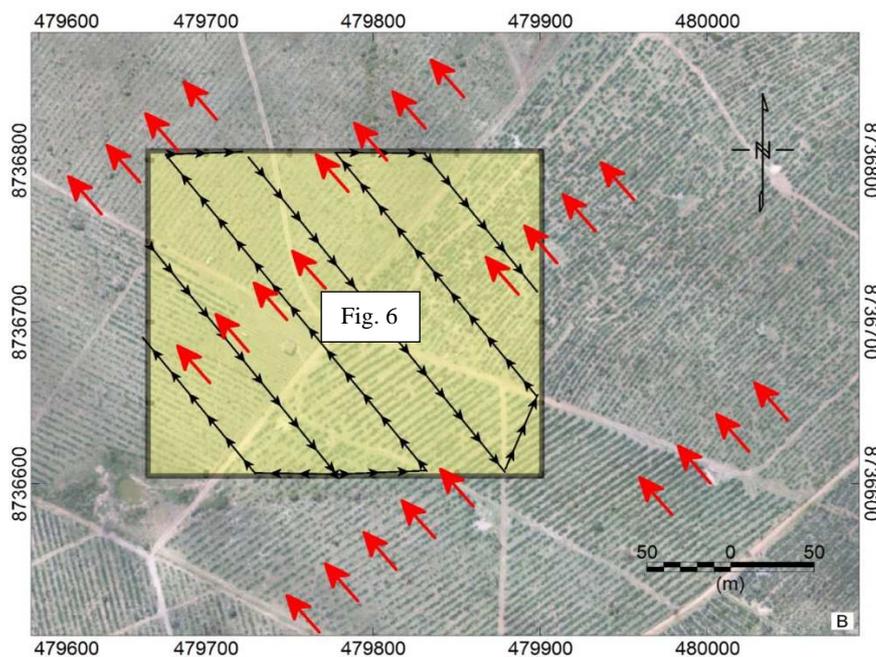


**Fig. 4:** VANT multirrotor modelo Phantom 4 Advanced com dispositivo coletor aeromicrobiano acoplado (A). Perfil de voo do aerolevanteamento realizado no dia 16/08/2018 para a altura de 20 m na Fazenda Vitória, mostrando a relação entre abertura e fechamento das placas de Petri durante o procedimento de coleta de esporos fúngicos em altura específica (B).

As rotas de voo foram orientadas paralelamente na direção das correntes de vento, de modo que, em ambas as datas de coleta, as linhas de voo foram dispostas na direção NW-SE (Figs. 5 e 6). Para a altura de 1 m, a aeroamostragem foi feita de forma manual por

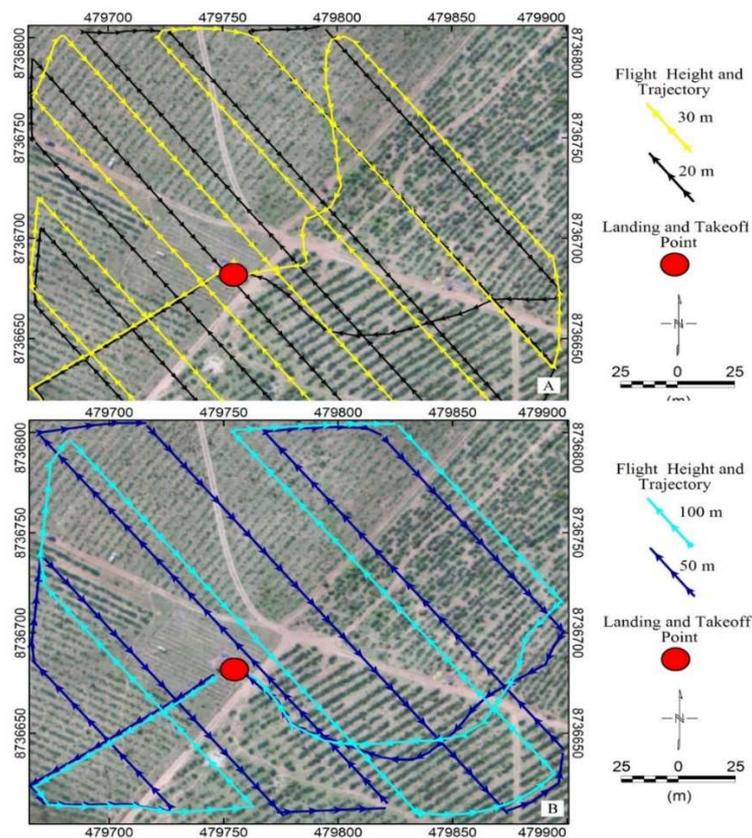
meio de caminhamentos em trajetos aleatórios dentro das áreas de estudo, com as duas placas de Petri abertas e variando nas posições vertical e horizontal em relação aos ventos.

Os dados climáticos de umidade dos dias 16/08/2018 e 26/03/2019 foram coletados através da estação meteorológica automática de Serrinha/BA (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3), pertencente a rede de estações meteorológicas do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), essa estação meteorológica é a mais próxima das áreas de estudo.



**Fig. 5:** Mapa com a representação das correntes de ventos (setas vermelhas) e das linhas de voo planejada para os aerolevantamentos (linhas pretas com setas) na Fazenda Vitória seguindo a direção NW-SE.

Ao pousar o veículo aéreo não-tripulado, as placas de Petri foram removidas e imediatamente vedadas com para-filme em volta da borda das tampas, colocadas em caixa de isopor para serem transportadas para o laboratório de Microbiologia Agrícola no campus da UFRB / Cruz das Almas, Bahia.



**Fig. 6:** Mapa de posição dos aerolevantamentos na Fazenda Vitória com orientação das linhas de voo para as alturas de 20 e 30 m (A), e 50 e 100 m (B).

## 2.4 Isolamento e Identificação Morfológica dos Fungos

Em laboratório, as placas de Petri das aeroamostragens foram incubadas em incubadora com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. O acompanhamento do crescimento e contagem das colônias de fungos foram realizadas diariamente, até não serem observadas mais colônias novas. As colônias com características morfológicas típicas do *A. welwitschiae* e as demais colônias que cresceram foram repicadas em placas de Petri com meio BDA para purificação das culturas e estas foram preservadas em água estéril pelo método Castellani e mantidas a temperatura ambiente e também em glicerol 30%, sendo estas congeladas. Para a identificação dos fungos por características morfológicas foram preparadas lâminas microscópicas e estas foram observadas em microscópio ótico de luz com aumento de 400X, quanto as características das hifas, estruturas de frutificação e conídios.

### 2.2.5 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade com os isolados aéreos morfológicamente identificados como *A. welwitschiae* foi realizado em bulbilhos de sisal (com aproximadamente 3 meses de idade) em casa de vegetação. O total de 13 isolados referentes as diferentes altitudes das três fazendas foram selecionadas aleatoriamente para os testes de patogenicidade. Os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio BDA, por 5 dias com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C. Os inóculos foram preparados vertendo 20 ml de água destilada esterilizada nas placas com as culturas de fungos e raspagem das colônias com uma alça de inoculação estéril. As suspensões das colônias foram filtradas em gaze estéril, e as suspensões de esporos foram contadas em câmara de Neubauer num microscópio óptico e ajustadas com água estéril à concentração final de  $10^7$  ml. Bulbilhos de sisal saudáveis foram inoculados com a deposição do inóculo (100 µl de suspensão de esporos) com dois micro-ferimentos realizados com uma agulha hipodérmica no tecido do caule. Ao todo foram 13 tratamentos e 3 repetições. As plantas do tratamento controle foram tratadas no caule com micro-ferimentos e água destilada sem inóculo.

Todas as plantas foram observadas diariamente para sintomas da podridão vermelha. Após 30 dias as plantas foram cortadas ao longo de todo o seu comprimento, verticalmente, para a observação de sintomas internos no caule.

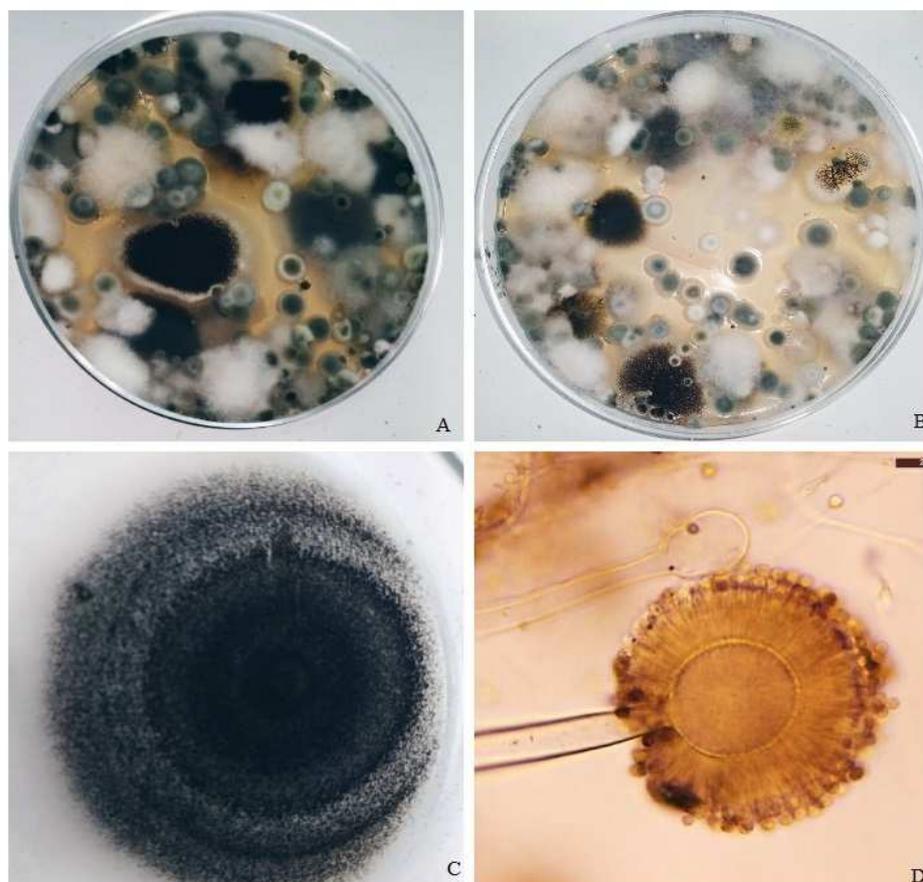
### 2.3 Resultados e Discussões

Para a confirmação da espécie *A. welwitschiae* são necessários estudos moleculares baseados no gene *CaM* - calmodulina, considerado o código de barras de DNA para identificação de espécies da seção *Nigri* (Hong et al., 2005; Samson et al., 2014; Susca et al., 2016; Duarte et al., 2018). Em áreas de produção de sisal, no semiárido da Bahia, foi confirmado que *Aspergillus welwitschiae* é o agente causal da podridão vermelha do sisal e todos os isolados de *Aspergillus* negros obtidos de plantas com sintomas de podridão vermelha e também do solo próxima as raízes de plantas de sisal foram identificados como sendo *A. welwitschiae* (Duarte et al. 2018). Assim, espera-se que todos os *Aspergillus* negros isolados das aeroamostragens sejam *A. welwitschiae*, mas como o *A. niger* e *A. welwitschiae*, conhecidos como *Aspergillus* negros, são indistinguíveis pelas características

morfológicas dos esporos (Varga et al., 2011), a confirmação virá com a finalização das etapas do estudo molecular.

Os *Aspergillus* negros, identificados morfológicamente como sendo *A. welwitschiae* foram isoladas nas amostras aéreas das três fazendas (Fig.7, Fig 8) e a dispersão dos esporos fúngicos foi observada nas duas camadas atmosféricas limitantes SBL e PBL (Fig.8). Nas três fazendas estudadas observou-se a presença de esporos de *A. welwitschiae* em ambas as camadas atmosféricas SBL (1m, 20 m e 30 m) e PBL (50 m e 100 m) o que confirma que o ar é uma forma de disseminação do patógeno na região sisaleira.

As características macromorfológicas utilizadas na caracterização dos isolados incluíram, cor do micélio, esporulação, exsudatos e reversões de colônias. Algumas das características micromorfológicas observadas para caracterizar as espécies foram a forma das vesículas, conidióforos e os conídios, formas e texturas de estipes e fiáldes (Fig.7), conforme Samson et al., (2014).



**Fig. 7:** Placas provenientes das aeroamostragens, após incubação a 25 °C, com fotoperíodo, por sete dias SBL 20m e PBL 50m respectivamente (A e B) Aspectos macro e micromorfológicos do *Aspergillus welwitschiae* isolados das coletadas com VANT (C e D).

### 2.3.1 Associações na SBL

O maior número de esporos de *A. welwitschiae* foi encontrado na camada SBL (com a formação de 19 colônias em meio BDA na primeira coleta – 16/08/2018 e 7 colônias na segunda coleta – 26/03/2019) (Fig. 8), o que nos indica que dentro das fazendas estudadas há dispersão do *A. welwitschiae* pelo ar, causada possivelmente por uma ou mais fontes constantes do inóculo. Observamos que todas as áreas de estudo apresentam plantas com sintomas da podridão vermelha e plantas mortas pela podridão vermelha dispersas no campo. Isard, 2005 salienta que, a dispersão de esporos pelo vento dentro de uma mesma fazenda geralmente é limitada a centenas de metros, dentro do mesmo campo, onde ocorre um foco do patógeno, e esse fato recebe o nome de difusão focal.

Podemos inferir que as três fazendas estudadas apresentaram elevado índice de difusão focal, apresentando os maiores números de esporos nas alturas referentes a SBL, causadas pela presença de uma ou mais fontes do inóculo próximo ao solo. Componentes climáticos importantes nessa escala e que influenciam diretamente a difusão focal incluem os ventos e a umidade, os quais são responsáveis pela distribuição do inóculo através de centenas de metros e sua deposição. Para entendermos como a difusão focal acontece temos que investigar primeiramente os possíveis pontos de focos primários de contaminação. Focos primários são áreas fontes de esporos fortemente influenciadas pelos ventos com expansão radial constante. A taxa de disseminação do foco primário vai de alguns centímetros por dia evoluindo para centenas de quilômetros por ano (Aylor, 2002; Aylor, 2003; Techy, 2010).

Estudos atribuem ao processo de colheita e produção em áreas agrícolas como os principais agentes promotores das fontes de inóculos no ar (Aylor, Schmale, Shields, Newcomb & Nappo, 2011). O foco primário da infecção nas fazendas estudadas pode ser explicado pela incidência da podridão vermelha e a expansão da doença por meio do corte de uma planta infectada, resto de plantas doentes no solo, transporte de folhas infectadas dentro da propriedade, partículas de solo suspensas no ar e arrastadas pelos ventos, fato esse que pode causar a disseminação do fungo.

O *A. welwitschiae* é um fungo necrotrófico, ou seja, seu micélio continua a colonizar os tecidos da mortos da cultura, nutrindo suas estruturas reprodutivas, as quais, por sua vez, produzem esporos por tanto tempo quanto existirem nutrientes para o patógeno. Plantas doentes arrancadas do solo, restos da planta nas fazendas são a fonte de esporos de *A. welwitschiae* para a atmosfera e veículo de disseminação da doença.

Esses processos influenciados pelos ventos e sua direção possivelmente são os responsáveis pelos focos primários de esporos de *A. welwitschiae* nas fazendas. O papel do vento na dispersão de esporos foi revisado por Aylor 2003, onde constatou-se que rajadas fortes de ventos são capazes de dispersar esporos da superfície de folhas, solo ou plantas infectadas.

Outro fator que corrobora para a alta difusão focal nas fazendas estudadas e disseminação da podridão vermelha pelo ar nas alturas referentes a SBL é o tipo de esporo do patógeno em questão. Sabemos que o *Aspergillus* é um dos gêneros de fungos que apresentam esporos do tipo seco e esses esporos hidrofóbicos são facilmente disseminados pela força passiva do ar (Zeng, 2015; Woo, An, Xu, S.-M., & Yamamoto 2018).

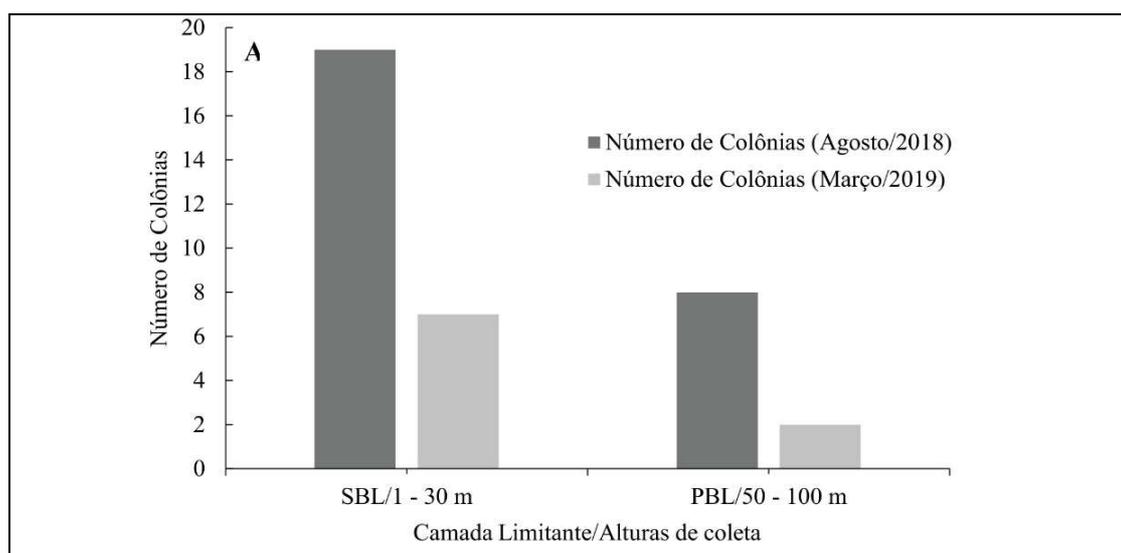
Num cenário de propagação diária de esporos de *A. welwitschiae* provenientes de focos primários em um campo que contenha hospedeiros viáveis (como é o caso das fazendas estudadas) e condições favoráveis para o patógeno, como por exemplo, lesões de origem mecânica ou fisiológica nas plantas de sisal, a doença tem as condições ideais para dispersão nas áreas.

### **2.3.2 Associações na PBL**

No início a difusão focal do *A. welwitschiae* é restrita a uma mesma fazenda, mas pode se espalhar sobre muitos outros campos ou até mesmo áreas de várias centenas de quilômetros quadrados durante um único cultivo devido a expansão do foco primário em focos secundários e terciários. Os isolados de *Aspergillus* negros encontrados na PBL, ou seja, nas alturas 50 e 100, formaram 8 colônias em meio BDA na primeira coleta – 16/08/2018 e 2 colônias na segunda coleta – 26/03/2019 (Fig. 8).

A PBL está relacionada à dispersão do fungo pelo ar e, possivelmente pela disseminação dos esporos a milhares de metros. O transporte que ocorre na PBL geralmente implica no alastramento dos esporos por longas distâncias.

Esses eventos são geralmente difíceis de ocorrer devido a uma série de fatores ambientais como a morte dos esporos por temperatura e radiação UV, turbulências atmosféricas e direção dos ventos ou retirada dos esporos do ar por umidade (Singh, Hodson, Huerta-Espino, Jin & Bhavani, 2011).



**Fig. 8:** Número de colônias de *A. welwitschiae* obtidas nas amostragens das camadas limitantes SBL e PBL. As coletas na SBL ocorreram nas alturas de 1, 20 e 30 m, enquanto que na PBL as mesmas ocorreram nas alturas de 50 e 100 m.

Após atingirem a camada superior, os esporos fúngicos são transportados pelo vento, sendo carregados verticalmente e horizontalmente. Para a maioria dos esporos dispersos a seco, sua concentração em grandes altitudes depende da facilidade com que os esporos são destacados da estrutura de frutificação x condições atmosféricas (Zeng, 2015). Essas condições verticais são: velocidade dos ventos e turbulência. Horizontalmente, esses esporos interagem com diversas outras condições atmosféricas como temperatura, radiação UV, direção dos ventos, remoção atmosférica pelo processo de deposição, além da eficiência de deposição dos esporos em tecido suscetível (Skelsey, Holtslag & Werf, 2008).

Radiação UV na alta atmosfera pode afetar a sobrevivência dos esporos transportados para a PBL, porém, considerando os esporos negros de *A. welwitschiae*

sugere-se a proteção dos esporos pela presença da melanina, pigmento presente nas paredes de esporos com pigmentação escura (Yates, 2016).

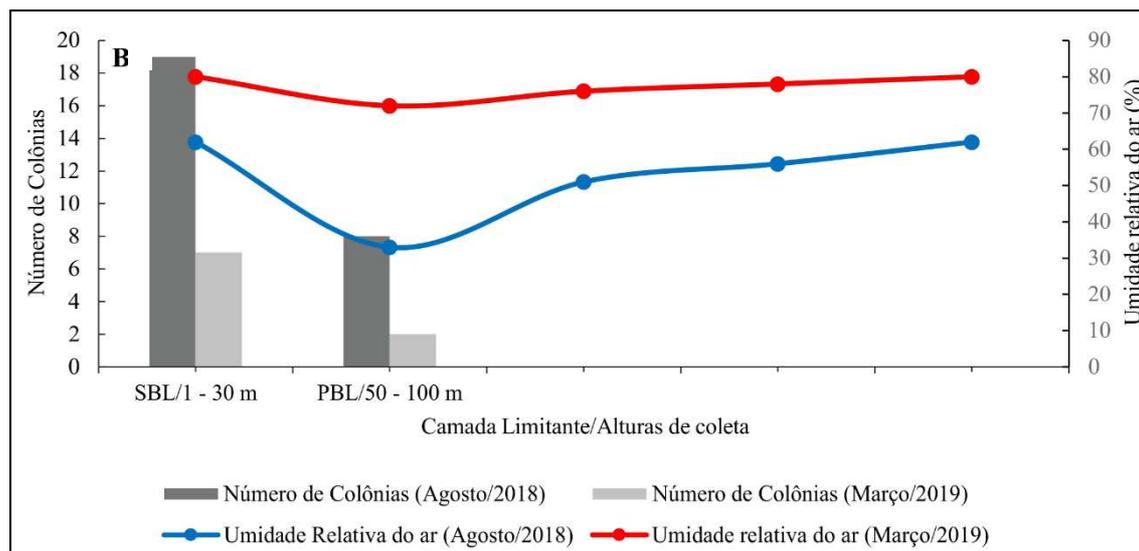
Mediante as características apresentadas podemos dizer que os esporos de *Aspergillus* negros possuem adaptabilidade à dispersão aérea no semiárido Baiano, devido sua dispersão a seco e resistência à estresses como a insolação dos esporos devido a presença da melanina. Observou-se que uma porcentagem de esporos atingiu as camadas mais altas, podendo levar o patógeno a atingir outras fazendas produtoras.

### **2.3.3 Associações com a Umidade Relativa do Ar**

Estudos realizados mundialmente confirmam a elevada influência dos fatores climáticos, principalmente dos ventos e da umidade no processo de transporte de esporos na atmosfera (Aylor, 2001; Pakpour, De-Wei, & Klironomos, 2015; Schmale & Ross, 2015). Em áreas com pouca variação climática, como é o caso do semiárido Baiano, estudos indicam a umidade relativa do ar como sendo a variável climática que mais influência a quantidade de esporos na atmosfera (Kasprzyk, Grinn-Gofroń, Strzelczak & Wolski, 2011; Priyamvada, 2017). Partindo dessa consideração podemos analisar os picos de esporos em determinadas alturas em função dessa condição climática presente nos dias da coleta.

A maior umidade relativa do ar foi observada em março de 2019 (segunda coleta) com média de 68%, período em que ocorreu a menor densidade de esporos na atmosfera. Os menores valores de umidade relativa do ar foram observados em agosto de 2018 (primeira coleta) com média de 53,2%, período em que se observou a maior quantidade de esporos na camada SBL (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Fig. 9).

Sabe-se que esporos que são dispersos em ambiente mais úmido podem ser removidos das superfícies das folhas, serrapilheira, ou da atmosfera superior por gotas de chuva. Isso normalmente ocorre quando as primeiras gotas de chuva caem e pode resultar em concentrações diminutas de esporos na atmosfera (Woo, An, Xu, S.-M., & Yamamoto 2018; Tang et al., 2018; Nath et al., 2019).



**Fig. 9:** Gráfico de barras da Figura 8 e sua associação com a umidade relativa do ar no período de coleta aeromicrobiana. As coletas na SBL se deram nas alturas de 1, 20 e 30 m, enquanto que na PBL as mesmas ocorreram nas alturas de 50 e 100 m. Os dados de umidade relativa do ar foram obtidos a partir da estação meteorológica da cidade de Serrinha/BA, disponível no site do instituto nacional de meteorologia ([www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br)).

Também pode haver dispersão dos esporos para o solo através dos respingos de gotas de chuva. Gotas muito grandes carregadas de esporos não são afetados pelo vento, porém, tendem a continuar no mesmo local ou serem removidas diretamente para o solo por arrastamento interferindo no transporte pelo ar (Nath et al., 2019).

Esse padrão de influência na quantificação de esporos aéreos de *Aspergillus* negros, em região semiárida quando comparado com a umidade também foi observado por Almaguer (2013), em região tropical, sugerindo que essa condição climática influencia aumentando a deposição de esporos fúngicos para o solo e dificultando seu transporte aéreo.

### 2.3.4 Teste de Patogenicidade

Todos os isolados aéreos de *Aspergillus* de cor negra causaram sintomas de podridão vermelha em bulbilhos de sisal, em condições de casa de vegetação. As plantas apresentaram sintomas internos no caule (Fig. 10). Estes resultados indicam que os *Aspergillus* dispersados no ar, nas camadas SBL e PBL na região do sisal são patogênicos ao sisal e causam a podridão vermelha do caule.



**Fig. 10:** Sintomas da doença da podridão vermelha em bulbilhos de sisal cultivados em casa de vegetação e inoculados com isolados de *Aspergillus* negros, potencialmente *A. welwitschiae* das aeroamostragens na região sisaleira da Bahia. Foto: Beatriz Damasceno, UFRB.

## 2.4 Conclusões

Esporos de *Aspergillus* identificados morfológicamente como sendo *Aspergillus welwitschiae* estiveram presentes na atmosfera da região sisaleira.

O coletor aeromicrobiano é eficaz no estudo aerobiológico de fungos e permitiu estudar a dispersão do *Aspergillus welwitschiae* pelo ar em áreas de produção de sisal no semiárido da Bahia.

A densidade de esporos de *A. welwitschiae* na atmosferana da região semiárida da Bahia, nas áreas de produção de sisal varia com os gradientes de altitude.

A variação de esporos fúngicos transportados nas escalas atmosféricas foi maior na zona de deposição (SBL) do que na zona de transporte (PBL).

Possivelmente o foco presente nas fazendas de estudo é proveniente de plantas com sintomas de podridão vermelha, solo contaminado e plantas mortas pela doença, deixadas nos plantios de sisal.

Alta umidade possivelmente atua aumentando a deposição de esporos fúngicos para o solo e dificultando seu transporte atmosférico.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado e recurso PROAP, de apoio a pós-graduação; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, projeto NEXUS: Integração Caatinga-Sisal, processo n. 441625/2017-7 e a bolsa de produtividade em pesquisa (processo n.308771/2017-6). À FAPESB pela infraestrutura de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

## Referências

Abraham, P. E., Yin, H., Borland, A. M., Weighill, D., Lim, S. D. & De Paoli, H. C. (2016). Transcript, protein, and metabolite temporal dynamics in the CAM plant Agave. *Nature Plants*, 2(12).

Aira, MJ, Rodríguez-Rajo FJ, Fernández-González M, Seijo C, ElviraRendueles B, Abreu I, Gutiérrez-Bustillo M, Pérez-Sánchez E, Oliveira M, Recio M, Tormo R, Morales J (2013). Spatial and temporal distribution of *Alternaria* spores in the Iberian Peninsula atmosphere, and meteorological relationships: 1993–2009. *J Biometeorol* 57(2), 265–274  
Alghamdi, M.A., Shamy, M., Redal, M.A., Khoder, M., Awad, A.H. & Elserougy, S. (2014). Microorganisms associated particulate matter: a preliminary study. *Science of The Total Environment*, 479-480, 109-116.

Almaguer, M., Aira, M.-J., Rodríguez-Rajo, F. J., & Rojas, T. I. (2013). Temporal dynamics of airborne fungi in Havana (Cuba) during dry and rainy seasons: influence of meteorological parameters. *International Journal of Biometeorology*, 58(7), 1459–1470.

Almaguer-Chávez, M., Aira, M.-J., Rojas, T.-I., Fernández-González, M., & Rodríguez-Rajo, F.-J. (2018). New findings of airborne fungal spores in the atmosphere of Havana, Cuba, using aerobiological non-viable methodology. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*.

Aylor DE. (2003). Spread of plant disease on a continental scale: role of aerial dispersal of pathogens. *Ecology*, 84, 1989–97

Aylor DE. 2002. Aerobiology of fungi in relation to capture and release by plants, p 341–361. In Lindow SE, 3.2.8. *Aerobiology of Agricultural Pathogens* ■ 3.2.8-15 Hecht-Poinar EI, Elliott VJ (eds), Phyllosphere microbiology. APS Press, St. Paul, MN.

Aylor DE., Schmale DG., Shields EJ., Newcomb M. & Nappo CJ. (2011). Tracking the potato late blight pathogen in the atmosphere using unmanned aerial vehicles and Lagrangian modeling. *Agricultural and Forest Meteorology*, 151(2), 251–260

Aylor, D.E., Flesch, T.K., 2001. Estimating spore release rates using a Lagrangian stochastic simulation model. *J. Appl. Meteorol.* 40, 1196–1208.

Barberan, A., Ladau, J., Leff, J.W., Pollard, K.S., Menninger, H.L., Dunn, R.R. & Fierer, N. (2015). Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi. *Academy of Sciences*, 112(18), 5756–5761.

Borland AM, Yang X. 2013. Informing the improvement and biodesign of crassulacean acid metabolism via system dynamics modelling. *New Phytologist* 200, 946–949.

Davis, S. C., Kuzmick, E. R., Niechayev, N. & Hunsaker, D. J. (2017). Productivity and water use efficiency of *Agave americana* in the first field trial as bioenergy feedstock on arid lands. *Glob. Change Biol. Bioenergy*, 9(2), 314–325

Duarte, E. A. A., Damasceno, C. L., de Oliveira, T. A. S., Barbosa, L. de O., Martins, F. M., de Queiroz Silva, J. R., ... Soares, A. C. F. (2018). Putting the Mess in Order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 9.

Grinn-Gofroń A, Strzelczak A (2011) The effects of meteorological factors on the occurrence of *Ganoderma* sp. spores in the air. *Int J Biometeorol* 55(2), 235–241

Hayashida, R., Kojima, T. (2015). Measurement of living airborne microbes using sheet type Aerobic count plates. *Eurozoaru Kenkyu*, 30, 198-206.

Hong, S. B. et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, v. 97, p. 1316-1329, 2005.

Isard SA, Gage SH, Comtois P, Russo JM. 2005. Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. *BioScience* 55:851–861.

Kasprzyk I, Grinn-Gofroń A, Strzelczak A, Wolski T (2011) Hourly predictive artificial neural network and multivariate regression trees models of *Ganoderma* spore concentrations in Rzeszów and Szczecin (Poland). *Sci Total Environ* 409(5), 949–956

Martin, A.R.; Martins, M.A.; Mattoso, L.H.C.; Silva, O.R.R.F. Caracterização Química e Estrutural de Fibra de Sisal da Variedade *Agave sisalana*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 19, no 1, p. 40-46, 2009.

- Massi, F. P., Sartori, D., de Souza Ferranti, L., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Vieira, M. L. C., & Fungaro, M. H. P. (2016). Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 221, 19–28.
- Moreira, J.A.N.; Silva, O.R.R.F.; Amorim NETO, M.S.; Beltrão, N.E.M.; Vale, L.V.; Santos, R.F. Declínio do sisal e medidas para seu soerguimento no nordeste brasileiro. Embrapa Algodão, Campina grande, 1996.
- Nath S, Ahmadi SF, Gruszewski HA, Budhiraja S, Bisbano CE, Jung S, Schmale III DG, Boreyko JB. 2019 ‘Sneezing’ plants: pathogen transport via jumping-droplet condensation. *J. R. Soc. Interface* 16: 20190243.
- Oke TR. (1987). *Boundary Layer Climates*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 2nd ed.
- Ortiz, D. G., and Van der Meer, P. (2006). Claves de las especies del género *Agave*, L. cultivadas como ornamentales en la Península Ibérica e Islas Baleares. Keys to the *Agave*, L. species cultivated as ornamental in Spain. *Acta Bot. Barc.* 50, 441–457.
- Pakpour, S., De-Wei, L., & Klironomos, J. (2015). Relationships of fungal spore concentrations in the air and meteorological factors. *Fungal Ecology*, 13, 130–134.
- Pasanen, A.L., Pasanen, P., Jantunen, M.J. & Kalliokoski, P. (1991). Significance of air humidity and air velocity for fungal spore release into the air. *Atmos. Environ. Part A. Gen. Top.* 25, 459-462.
- Priyamvada, H., Akila, M., Singh, R. K., Ravikrishna, R., Verma, R. S., Philip, L., ... Gunthe, S. S. (2017). *Terrestrial Macrofungal Diversity from the Tropical Dry Evergreen Biome of Southern India and Its Potential Role in Aerobiology*. *PLOS ONE*, 12(1).
- Rouso, K. (2010). *Maguery Journey: Discovering Textiles in Guatemala*. Tucson: University of Arizona Press. Saccardo, P. A. (1883). *Florula Mycologica Lusitanica*. *Bolet. Soc. Brot.* 11, 9–90
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbaken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., ... Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173.
- Schmale, D. G., & Ross, S. D. (2015). Highways in the Sky: Scales of Atmospheric Transport of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 591–611.
- Silva, F. P. M. A.; Ortega, A. C. (2014). Arranjo produtivo local (APL): a experiência no Território do Sisal na Bahia. In: encontro de economia baiana – Salvador: planejamento e estratégias de desenvolvimento – Homenagem ao centenário de Rômulo Almeida. Salvador: *SEI*, 213-238.
- Silva, F. P. M. A.; Ortega, A. C. (2016). Arranjo produtivo local (APL): a experiência no Território do Sisal na Bahia. In: encontro de economia baiana – Salvador: planejamento e

estratégias de desenvolvimento – Homenagem ao centenário de Rômulo Almeida. Salvador: *SEI*, 213-238.

Singh, R. P., Hodson, D. P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Bhavani, S., Njau, P., ... Govindan, V. (2011). The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 465–481.

Skelsey, P., Holtslag, A.A.M. & van der Werf, W. (2008). Development and validation of a quasi-Gaussian plume model for the transport of botanical spores. *Agricultural and Forest Meteorology*, 148(8-9), 1383–1394.

Skjøth, C.A., Damialis, A., Belmonte, J., De Linares, C., Fernandez-Rodriguez, S., Grinn-Grofron, ... Werner, M. (2016). Alternaria spores in the air across Europe: abundance, seasonality and relationships with climate, meteorology and local environment. *Aerobiologia*, 32(1), 3-22.

Susca, A. et al. Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. e1412, 2016.

Tang, K., Huang, Z., Huang, J., Maki, T., Zhang, S., Ma, X., Shi, J., Bi, J., Zhou, T. & Wang, G. (2018). Characterization of atmospheric bioaerosols along the transport pathway of Asian dust during the Dust-Bioaerosol 2016 Campaign. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 18, 1-41.

Techy, L., Schmale, D. G., & Woolsey, C. A. (2010). Coordinated aerobiological sampling of a plant pathogen in the lower atmosphere using two autonomous unmanned aerial vehicles. *Journal of Field Robotics*, n/a–n/a.

Varga, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, v. 69, n. 1, p. 1-17, 2011

Velez-Pereira, A.M., De Linares, C., Delgado, R. & Belmonte, J. (2016). Temporal trends of the airborne fungal spores in Catalonia (NE Spain), 1995-2013. *Aerobiologia*, 31(1), 23-37.

Woo, C., An, C., Xu, S., Yi, S.-M., & Yamamoto, N. (2018). Taxonomic diversity of fungi deposited from the atmosphere. *The ISME Journal*, 12(8), 2051–2060.

Zeng X, Wei S, Sun L, Jacques D a., Tang J, Lian M, Ji Z, Wang J, Zhu J, Xu Z. 2015. Bioleaching of heavy metals from contaminated sediments by the *Aspergillus niger* strain SY1. *J Soils Sediments* 15:1029–1038.

Zhang, D., Murata, K., Hu, W., Yuan, H., Li, W., Matsusaki, H. & Kakikawa, M. (2017). Concentration and viability of bacterial aerosols associated with weather in asian continental outflow: current understanding. *Aerosol Science and Engineering*, 1(2), 66-77.

---

## **ANEXO: Relatório descritivo do Dispositivo coletor aeromicrobiano acoplável em aeronave remotamente pilotada**

---

### **BREVE APRESENTAÇÃO**

[001] Trata a presente solicitação de Patente de Invenção (PI) de um inédito produto denominado de **DISPOSITIVO COLETOR AEROMICROBIANO ACOPLÁVEL EM AERONAVE REMOTAMENTE PILOTADA**, cuja proposta é o de revelar de forma detalhada e reivindicar proteção para um dispositivo destinado preferencialmente para à realização de amostragem de microrganismos benéficos e patogênicos presentes no ar.

[002] Assim, mais especificamente, a presente invenção diz respeito a um dispositivo que compreende um conjunto de articuladores (3), suporte de mesa de servo motor (2) para adaptar o motor e fazê-lo abrir e fechar parte do dispositivo, geometrias circulares para acoplar duas placas de Petri (4a e 4b) e o encaixe superior (1) projetável em Aerovanes Remotamente Pilotadas (ARP). É importante destacar que o atual problema existente no estado da técnica é a inexistência de dispositivos portáteis e de baixo custo, bem como, com adequada eficiência para a coleta, amostragem e determinação de microrganismos presentes no ar e que possa ser acoplado em aeronave remotamente pilotada. Dessa forma, a presente invenção traz como solução a possibilidade de realizar investigação de atividades microbianas entre as alturas de 1 até 120 metros em relação ao ponto de decolagem no solo, que são permitidos e regulamentados no Brasil pela ICA 100-40 do Departamento de controle do espaço aéreo brasileiro (DECEA).

[003] Para comprovar o mérito da invenção proposta, destaca-se que não há no mercado nacional ou internacional produtos com a mesma estrutura e características da invenção aqui proposta. O dispositivo pode ser confeccionado em plástico de poliácido láctico, dentre outros materiais compatíveis, e compreende duas partes, sendo uma delas uma base de acoplamento, suporte da eletrônica e suporte para os pratos da placa de Petri,

e a outra um suporte para tampas das placas de Petri.

[004] Dessa forma, a invenção aqui reivindicada apresenta caráter inovador e atende aos requisitos de patenteabilidade: novidade, atividade inventiva e aplicação industrial. Ressalta-se como principal vantagem apresentada pela invenção, a remoção do tempo gasto para confecção do casquete e as despesas com os materiais utilizados, otimizando o tempo clínico necessário para essa etapa do tratamento reabilitador protético e garantindo a execução da técnica de forma prática, segura, com elevada eficiência e com baixo custo.

[005] Dentro do contexto apresentado, o presente documento de patente de invenção tem como objetivo descrever de forma detalhada e suficientemente clara todo o processo de obtenção do dito **DISPOSITIVO COLETOR AEROMICROBIANO ACOPLÁVEL EM AERONAVE REMOTAMENTE PILOTADA**, bem como, revelar a sua aplicação e utilização preferencial para a para à realização de amostragem de microrganismos benéficos e patogênicos presentes no ar e acoplado em aeronave remotamente pilotada, definido neste documento como a melhor forma de uso.

### **CAMPO DE APLICAÇÃO**

[006] A presente invenção refere-se a um dispositivo com aplicação na coleta de amostras para realizar a investigação de atividades microbianas entre as alturas de 1 até 120 metros, acoplado no motor de aeronaves remotamente pilotada. Dessa forma, o dito dispositivo pode ser amplamente empregado nas áreas de pesquisa, desenvolvimento, e/ou inovação em engenharia, robótica, física e microbiologia, dentre outras e não limitando de maneira alguma a apenas essas áreas. Mais especificamente, o dito dispositivo possui aplicação e uso para o i) monitoramento da qualidade microbiológica do ar e seus impactos na saúde animal e vegetal; ii) monitoramento da dispersão vertical e horizontal sazonal de microrganismos benéficos e patogênicos aplicados aos setores da agropecuária e saúde humana e iii) coleta de microrganismos aéreos e investigação da diversidade taxônomica desses baseados nas relações com microrganismos encontrados na biota terrestre, aquática e no solo.

### **FUNDAMENTOS DA TÉCNICA**

[007] Segundo a Agência Nacional de Aviação Civil, Aeronaves Remotamentes

Pilotadas (RPA) são aeronaves não tripuladas, pilotadas a partir de uma estação de pilotagem remota com finalidade diversa. São veículos aéreos sem tripulação, que podem ou não ser pilotados por um humano, mas se o for, será à distância [ALMEIDA, J. A. - Normas de segurança para implantação dos RPA civis no espaço aéreo brasileiro: uma nova abordagem. - *Conexão Sipaer*, 2010]. O controle normalmente se dá através de mecanismos de controle por rádio frequência (RF), utilizados através de controle remoto, que pode ser feito observando o trajeto do RPA, com contato visual, ou simplesmente acompanhando imagens transmitidas por este, ou ainda, através de rota pré-estabelecida.

[008] Os RPA's, também conhecidos como Veículo Aéreo Não Tripulado (VANT) ou ainda pelo seu apelido de DRONE, veem sendo empregados em diversas áreas, dentre elas a militar e na agricultura. Na década de 70 a National Aeronautics and Space Administration (NASA) desenvolveu estudos para criação de um RPA para uso em altitudes elevadas, porém sem muito sucesso. Foi então que em 1990 o Environmental Research Aircraft and Sensor Technology (ERAST) deu um grande passo no sentido de viabilizar pesquisas científicas com o emprego de RPA's, criando protocolos e a capacidade de carregarem inúmeros sensores poderosos [WATTS, A. C. et al - Unmannedair craft systems inremote sensing and scientific resear ch: classification and considerations of use. - *Remote Sensing*, 2012].

[009] Fundamentado no ERAST, inúmeras organizações modificaram os RPA's para que suportassem suas pesquisas, para aplicações como amostragem atmosférica, monitoramento de vegetação de pastagens, e até mesmo empregado por hobby em radio-control (RC), envolvendo soluções com baixo custo e sendo radio controlados. Diante de uma vasta gama de variedades de RPA's cabe a classificação destes de acordo com suas características [WATTS, A. C. et al - Unmannedair craft systems inremote sensing and scientific resear ch: classification and considerations of use. - *Remote Sensing*, 2012]. Segundo a Agência Nacional de Aviação Civil, as aeronaves remotamente pilotadas estão divididas em três classes, de acordo com o peso máximo de decolagem, no qual deve ser considerado os pesos da bateria ou combustível do equipamento e de carga eventualmente transportada. A classificação é aplicável apenas para as RPA e não para os aeromodelos. Sendo ela dividida em i) classe 1 – peso máximo de decolagem maior que 150 kg; ii) classe 2 – peso máximo de decolagem maior que 25 kg e até 150 kg e iii) classe 3 – peso máximo de decolagem de até 25 kg.

[010] O emprego de RPA's está bastante disseminado em várias áreas do conhecimento [Lajús, C. R. et al. - Agricultura de precisão via aeronave remotamente

pilotada: uma alternativa para o homem do campo – *Revista de Computação aplicada ao Agronegócio*, 2018]. No Brasil os primeiros relatos iniciaram na década de 80 com o desenvolvimento do projeto Acauã pelo Centro Técnico Aeroespacial (CTA) [Medeiros, F. A. et al. - Utilização de um veículo aéreo não-tripulado em atividades de imageamento georeferenciado. - *Ciência Rural*, 2008]. Atualmente a agricultura de precisão investiga formas de monitoramento e aplicação de sensores para detecção das propriedades de cultura e de solo, quase que em tempo real. Neste contexto, o emprego de RPA's torna-se cada vez mais uma opção de capturar de imagens a centímetros de distância e com alta resolução, apresentando-se como uma alternativa mais barata, eficaz e eficiente em relação ao uso de imagens obtidas por satélite, as quais podem sofrer interferências das condições climáticas. Esta tecnologia é tida como uma solução bem interessante em áreas relativamente pequenas que precisam ser monitoradas [Primocerio, J. A - Flexible unmanned aerial vehicle for precision agriculture. - *Precision Agriculture*, 2012]

[011] Ademais, a utilização de imagens obtidas pelo emprego de RPA podem auxiliar na detecção de manchas, infestações de plantas daninhas, assim como para topografia e geração de mapas de produtividade. A utilização desta tecnologia vem cada vez mais se firmando como uma opção para auxiliar o produtor na identificação de estratégias para maximizar a rentabilidade [Tejada, P. J. et al. - Tree height quantification using very high resolution imagery acquired from an unmanned aerial vehicle (UAV) and automatic 3D photo-reconstruction methods. - *European Journal of Agronomy*, 2014].

[012] A distribuição vertical de esporos fúngicos na atmosfera revela sua disseminação na área circundante. O conhecimento sobre sua presença é necessário e não há tecnologia ou metodologia para monitorar a propagação da micoflora na altura especificada na atmosfera. Em tais casos, veículos aéreos não tripulados (UAVs) são amplamente utilizados [Udaya Prakash, N. K et al - Design, Development and Analysis of Air Mycoflora Using Fixed Wing Unmanned Aerial Vehicle (UAV) - *Journal of Applied Science and Engineering*, 2014]. Muitas inovações no desenvolvimento e uso de dispositivos de amostragem de ar ocorreram na fitopatologia desde a primeira descrição da armadilha de esporos tipo Hirst [McConie, K.C. - The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. - *Phytopathology*, 1964]. Isso inclui melhorias na eficiência de captura com taxas de coleta de volume de ar relativamente altas, métodos que facilitam o processamento de amostras com métodos de diagnóstico downstream e até automação completa de amostragem, diagnóstico e geração de relatórios sem fio. Outras inovações têm acarretado no

desenvolvimento de amostradores de ar em plataformas móveis, como UAVs e veículos terrestres, que a amostragem em diferentes altitudes e locais em um curto espaço de tempo para identificar fontes potenciais e estrutura populacional. Sistemas de Informação Geográfica e a aplicação a uma rede de amostradores podem permitir uma maior previsão do inóculo aéreo e da dinâmica de dispersão. Esse campo de tecnologia está se desenvolvendo rapidamente, à medida que novos métodos diagnósticos permitem quantificações cada vez mais rápidas e precisas de espécies transportadas pelo ar e características genéticas. A amostragem e a interpretação dos resultados, particularmente os limiares de ação, são melhorados pela compreensão dos componentes dos processos de dispersão e diluição do ar e podem adicionar maior precisão na aplicação dos produtos de proteção contra o crescimento das doenças de manejo da doença e da doença integrada [West, J.S - Innovations in air sampling to detect plant pathogens, 2014].

[013] Diante deste contexto, a presente patente de invenção tem como objeto principal revelar de forma detalhada o processo de obtenção e desenvolvimento do dito **DISPOSITIVO COLETOR AEROMICROBIANO ACOPLÁVEL EM AERONAVE REMOTAMENTE PILOTADA**, utilizado preferencialmente para à realização de amostragem de microrganismos benéficos e patogênicos presentes no ar e acoplado em aeronave remotamente pilotada, permitindo realizar a investigação de atividades microbianas entre as alturas de 1 até 120 metros em relação ao ponto de decolagem no solo. Assim, diante do apresentado, este documento visa requerer a proteção e direito de exclusividade da modalidade patente de invenção para o dito dispositivo, bem como, seu método de uso.

[014] Por fim, para fundamentação técnica da tecnologia apresentada e requerida proteção, a Literatura Técnica Especializada será descrita na próxima seção com o objetivo de apresentar os principais documentos de patentes que se relacionam com o objeto de proteção deste pedido, entretanto, que em hipótese alguma limitam a invenção reivindicada.

### **LITERATURA TÉCNICA ESPECIALIZADA**

[015] A literatura técnica especializada, realizada na base de patentes do Instituto Nacional de Aprendizagem Industrial (INPI) que compila o acervo de patentes depositadas do Brasil, e na base europeia de Patentes (Espacenet), que compila um acervo de patentes depositadas em mais de 90 países, não identificou nenhum documento de patente que faz

referência a invenção aqui proposta. A busca revelou alguns documentos de patentes, como por exemplo os pedidos US2018266922, CN105829860, US2004025963 e US6192767, que serão descritos a seguir, entretanto, nenhum deles fere o quesito de novidade ou da atividade inventiva da patente de invenção requerida nesse documento.

[016] O documento de patente americano **US2018266922** diz respeito a um dispositivo passivo e ativo para amostragem de partículas no ar (especialmente partículas de origem biológica) que inclui uma base de tamanho e forma variáveis tendo um corpo longitudinal, uma superfície interna e uma pluralidade de canais de ar, que permitem criar campos elétricos positivos e negativos, com espaçamento variável através do corpo longitudinal. A pluralidade de camadas de película ferroelétrica polarizada está disposta no corpo longitudinal com as suas direções de polarização opostas voltadas uma para a outra através de um intervalo de ar fixo para recolher as partículas carregadas e não carregadas. A invenção proposta no presente documento de patente difere da revelada no documento **US2018266922** no que tange à forma de coleta das partículas do ar, uma vez que da invenção aqui proposta as partículas aéreas são coletadas de forma passiva, pela passagem do RPA em suas trajetórias de voo em altitudes baixas, e ativa, com o deslocamento do ar exercido pelas hélices do RPA em direção às placas de Petri, as quais não usam campos elétricos polarizados; Além disso, na invenção aqui reivindicada, os mecanismos de acionamento envolvem a utilização de uma placa microcontroladora arduino nano para acionar o servo motor. Ademais, as geometrias do seu dispositivo coletor são circulares para acoplagem de placas de Petri ao invés de placas longitudinais. Portanto, não pode ser considerado como limitante para a solicitação de exclusividade do que é proposto neste documento de patente.

[017] O documento de patente chinês **CN105829860** revela um dispositivo amostrador de ar microbiano com uma placa para amostragem, detecção e / ou caracterização de partículas, por exemplo, por meio de coleta, crescimento e análise de partículas biológicas viáveis, como microrganismos. A invenção proposta no presente documento de patente difere da revelada no documento **CN105829860** devido a geometria de base de coleta da invenção aqui reivindicada, que possui duas bases de acoplamento circular para duas placas de Petri e à sua forma de acionamento com uso de sensor fotossensível para acionar o servo motor via placa microcontroladora, por isso, não pode ser considerada como pertencente ao estado da técnica que interfira no direito de exclusividade do que é solicitado nesta patente.

[018] Outro documento de patente americano **US2004025963** tem por objetivo

descrever um amostrador de ar compreendendo uma câmara de fluxo de ar tendo uma entrada e uma saída de ar, meios para introduzir líquido no ar que flui através da câmara de modo a arrastar quaisquer partículas presentes no fluxo de ar, meios para recolher o líquido de arrastamento e quaisquer partículas arrastadas no mesmo; para depositar o mesmo num recipiente de recolha, meios para devolver o líquido de arrastamento recolhido para a câmara de fluxo de ar, meios para detectar a presença de bolhas no líquido de retorno e operáveis para introduzir líquido de arrastamento no ar que flui através da câmara de fluxo de ar e meios para recolha de uma amostra do líquido de arrastamento e quaisquer partículas, que possam estar presentes no referido recipiente de recolha. A invenção proposta e reivindicada no presente documento de patente difere da revelada no documento **US2004025963** no que tange à ao tipo de partículas amostradas, pois em nossa invenção estamos interessados apenas em microorganismos (bactérias e fungos) e a forma de coleta que em nosso caso mesmo sendo passiva (pela passagem do RPA em trajetórias que coincidem com o deslocamento de microorganismos) e ativa (com o deslocamento de ar efetuado pelas hélices do RPA no sentido das placas de Petri), não há saída de ar. Portanto, não pode ser considerada como fator limitante para a novidade e atividade inventiva da invenção aqui proposta.

[019] Outro documento de patente americano **US6192767** revela um instrumento portátil para amostragem de partículas transportadas pelo ar, compreendendo uma câmara de amostragem, turbina aspirativa e uma caixa contendo um motor, um circuito elétrico e baterias recarregáveis, sendo a turbina conectada à câmara de amostragem e à caixa, sendo a câmara de amostragem e uma porta de saída. O dispositivo é descartável e inclui um corpo cilíndrico dividido em duas partes cilíndricas, cada parte tendo dentro, em uma parede, uma fita de acetato de celulose flexível, feito adesivo com uma substância. A invenção proposta no presente documento de patente difere da revelada no documento **US6192767** no que tange i) ao mecanismo de amostragem da invenção proposta utiliza um sensor fotossensível para acionar o servo motor via placa microcontroladora arduino que é alimentada pela própria bateria do RPA; ii) a forma de coleta das partículas do ar (na invenção aqui proposta as partículas aéreas são coletadas de forma passiva, pela passagem do RPA em trajetórias que coincidem com o deslocamento de microorganismos, e ativa, com o deslocamento do ar exercido pelas hélices do RPA no sentido das placas de Petri). Além disso as geometrias do dispositivo aqui proposto e reivindicado são circulares para acoplagem de placas de Petri ao invés de estruturas cilíndricas. Portanto, também não pode ser considerada como fator limitante para a novidade e atividade inventiva da invenção

aqui proposta.

[020] Com isso, o desenvolvimento e aplicação do coletor aeromicrobiano acoplável em aeronave remotamente pilotada proposto neste documento de patente de invenção possui o parâmetro de novidade, pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico compreendido no estado da técnica possui a tecnologia de desenvolvimento, obtenção e aplicação semelhantes. Destaca-se ainda que a tecnologia proposta neste documento de patente de invenção apresenta também os outros critérios de patenteabilidade, como atividade inventiva e aplicação industrial, requisitos estes necessários para a concessão da patente requerida.

### **VANTAGENS DA INVENÇÃO**

[021] Em relação às vantagens e diferenciais apresentados pela invenção aqui proposta, pode-se destacar como mais relevantes:

[022] A invenção possui baixo custo uma vez que a mesma pode ser estruturada em sua parte mecânica com uso de impressora 3D e os compartimentos de eletrônica (microcontrolador arduino nano, sensor de luz LDR, servo-motor e sistema de radiocomunicação) os quais também são componentes de baixo custo.

[023] A invenção proporciona mais praticidade no processo de amostragem do ar para análises microbianas uma vez que é acoplável em diversos tipos de Aeronaves Remotamente Pilotadas comerciais.

[024] A invenção contribui para diversos trabalhos tanto no âmbito acadêmico quanto técnico no que tange ao i) monitoramento da qualidade microbiológica do ar e seus impactos na saúde animal e vegetal; ii) monitoramento da dispersão vertical e horizontal sazonal de microrganismos benéficos e patogênicos aplicados aos setores da agropecuária e saúde humana;ii) coleta de microrganismos aéreos e investigação da diversidade taxônômica.

### **DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[025] A patente de invenção será, a seguir, explicado em seus detalhes, sendo que, a título ilustrativo, e de forma alguma limitante, são apresentadas as Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

[026] A Figura 1 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma

limitante, um esboço da base de acoplamento, suporte da eletrônica e suporte para as placas de Petri. Dessa forma, na Figura 1 apresenta-se uma vista superior da estrutura preferencialmente em poliláctico (PLA) onde podem ser identificados: base de acoplamento ao trem de pouso da ARP (1); mesa de servo (2), onde é acoplado o servomotor que irá atuar mecanicamente sobre a tampa; sistema de articulação entre as peças (3); suportes para acoplamento das placas de Petri (4a) e placa microcontroladora eletrônica (5).

[027] A Figura 2 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma limitante, a representação em vista superior das seguintes partes: clevis fastener (6), onde fica o sistema fixação composto por uma forquilha e pino de engate; braço de atuação (7); sistema de articulação entre as peças (3); suporte para as tampas das placas de Petri (4b).

[028] A Figura 3 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma limitante, a representação da vista isométrica da estrutura montada. 1- Base de acoplamento de trem de pouso; 2 – mesa de acoplamento de servo motor; 3 – articulares; 4a – suporte de acoplamento de placas de Petri; 4b – suporte para tampas das placas de Petri; 6 – clevis fastenet; 7 – braço de atuação.

[029] A Figura 4 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma limitante, a representação das dimensões da estrutura montada. 1- Base de acoplamento de trem de pouso; 2 – mesa de acoplamento de servo motor; 3 – articulares; 4a – suporte de acoplamento de placas de Petri; 4b – suporte para tampas das placas de Petri; 5 – suporte de acoplagem para placa microcontroladora; 6 – *clevis fastenet*; 7 – braço de atuação.

[030] A Figura 5 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma limitante, a representação do link de atuação (8) entre a mesa do servo-motor (2) e suporte para a tampa das placas (4b).

[031] A Figura 6 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma limitante, a representação do suporte para o sensor LDR (9).

[032] A Figura 7 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma limitante, a representação da placa microcontroladora Arduino nano (11).

[033] A Figura 8 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma limitante, a representação do sistema de radiocomunicação (rx/tx) 2,4GHz (12).

[034] A Figura 9 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma limitante, a representação do servo-motor eletromecânico de atuação angular.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[035] O objetivo principal deste pedido de patente de invenção é descrever com detalhes todos os componentes e método de uso do dito **DISPOSITIVO COLETOR AEROMICROBIANO ACOPLÁVEL EM AERONAVE REMOTAMENTE PILOTADA**, onde o dito dispositivo pode ser empregado para à realização de amostragem de microrganismos benéficos e patogênicos presentes no ar e acoplado em aeronave remotamente pilotada, e mais especificamente, permitindo realizar a investigação de atividades microbianas entre as alturas de 1 até 120 metros em relação ao ponto de decolagem no solo. Um importante diferencial apresentado pela tecnologia aqui revelada e reivindicada é que o dito dispositivo pode ser acoplado em diversos tipos de Aeronaves Remotamente Pilotadas comerciais, dessa forma, a versatilidade apresentada garante o seu grande potencial de aplicação. Torna-se importante destacar que o método/processo/técnica proporcionado pela invenção para o desenvolvimento do dispositivo, bem como, o dito dispositivo, é dotado de atividade inventiva, de baixo custo e de fácil operação, sendo, portanto, uma grande vantagem para permitir a sua aplicação industrial e fácil comercialização, além das vantagens anteriormente apresentadas.

[036] Ressalta-se que o dispositivo aqui desenvolvido e revelado possui como característica diferencial possuir grande potencial para ser aplicado para (a) monitoramento da qualidade microbiológica do ar e seus impactos na saúde animal e vegetal; (b) monitoramento da dispersão vertical e horizontal sazonal de microrganismos benéficos e patogênicos aplicados aos setores da agropecuária e saúde humana; (c) coleta de microrganismos aéreos e investigação da diversidade taxônômica desses baseados nas relações com microrganismos encontrados na biota terrestre, aquática e no solo, sendo que, tais aplicações são possíveis em virtude das características inovadoras do dispositivo desenvolvido.

[037] Dessa forma, neste documento são reveladas as características do dito dispositivo obtido, bem como, as partes que o compõe. Dentro do contexto apresentado e para que o dispositivo desenvolvido e seu método de uso, objetos de proteção desse pedido de patente, possam ser compreendidos e avaliados de forma mais clara e objetiva, sua descrição detalhada será feita a seguir.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[038] Nesta seção, uma descrição detalhada a respeito do dito **DISPOSITIVO**

**COLETOR AEROMICROBIANO ACOPLÁVEL EM AERONAVE REMOTAMENTE PILOTADA** será fornecida com o objetivo de explicitar todas as informações necessárias para o entendimento de todas as partes e componentes do dispositivo, bem como, tamanhos preferenciais e o funcionamento do mesmo. Serão apresentadas e reveladas informações sobre o desenvolvimento e concepção do dispositivo, comprovando assim a concretização da invenção requerida.

[039] O dito dispositivo foi desenvolvido com objetivos voltados para a inovação científica e tecnológica preferencialmente nas áreas da engenharia, robótica e física aplicadas em microbiologia. Desta forma, por meio da elaboração do design do dito dispositivo em ambiente computacional e impressão 3D, o conjunto de articuladores (3), suporte de mesa de servo motor (2) para adaptar o motor e fazê-lo abrir e fechar parte do dispositivo, geometrias circulares para acoplar duas placas de Petri (4a e 4b) e o encaixe superior (1) projetável em Aerovanes Remotamente Pilotadas foi possível construir o arcabouço estrutural do dispositivo. Com isso, o dito dispositivo traz uma tecnologia específica voltada preferencialmente para a amostragem de microrganismos benéficos e patogênicos do ar.

[040] Em relação a mecânica, a estrutura física do dispositivo foi desenvolvida em um software de modelagem assistida por computador obtendo-se o modelo tridimensional do equipamento. A materialização da estrutura pode ser realizada em plástico de poliácido láctico (PLA), ou outros polímeros, utilizando uma impressora 3D, ou extrusora ou equipamento com molde adequado. A estrutura deve ser desenvolvida preferencialmente em duas partes, denominadas aqui de parte A e parte B.

[041] A parte A do dispositivo deve ser formada pela base de acoplamento (1), suporte da eletrônica (5) e suporte para os pratos da placa de Petri (4) (conforme ilustrado na Figura 1). A parte B do dito dispositivo deve ser formada pelo suporte para tampas das placas de Petri (4b) (conforme ilustrado na Figura 2).

[042] Na Figura 1 apresenta-se uma vista superior da estrutura em PLA, entretanto, outros tipos de materiais e polímeros podem ser utilizados. O dito dispositivo preferencialmente deve apresentar uma base de acoplamento ao trem de pouso da ARP (1); uma mesa de servo (2), onde é acoplado o servo-motor que irá atuar mecanicamente sobre a tampa; um sistema de articulação entre as peças (3); e suportes para acoplamento das placas de Petri (4); e um suporte para acoplagem de placa microcontroladora arduino nano (5).

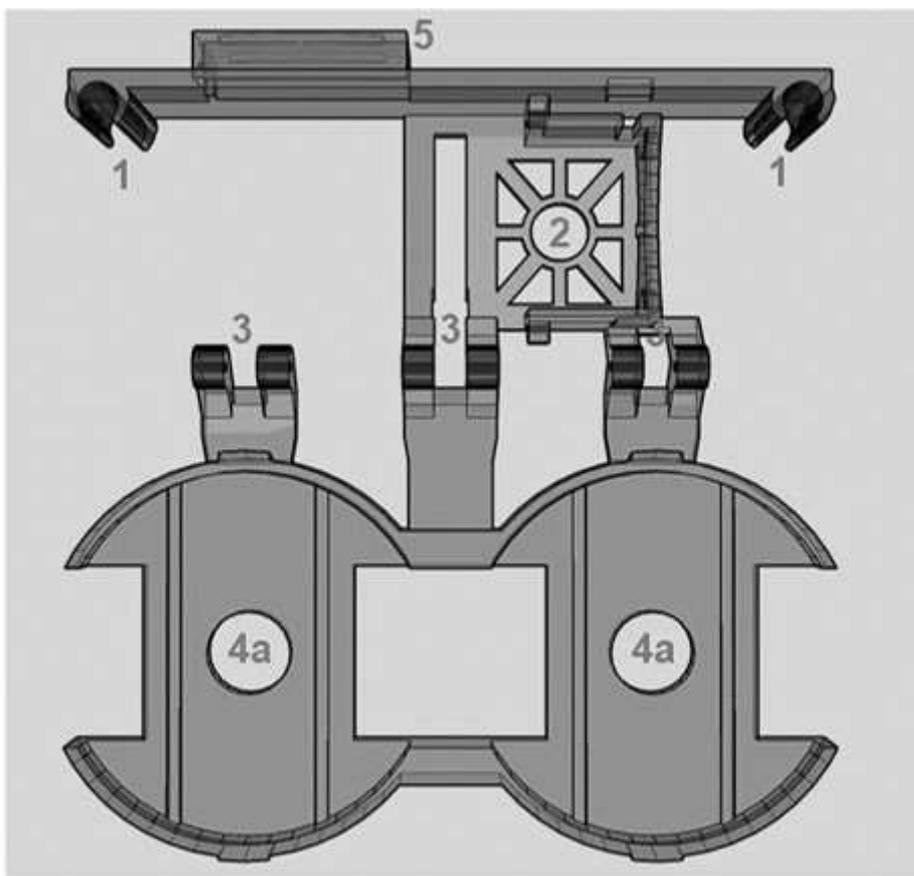


Figura 1

[043] Na Figura 2 apresenta-se um esquema de suporte para tampas das placas de Petri (4b). Dessa forma, o suporte para tampas de placas de Petri deve preferencialmente apresentar os seguintes componentes: clevis fastener (6), onde fica o sistema fixação composto por uma forquilha e pino de engate; braço de atuação (7); e, sistema de articulação entre as peças (3).

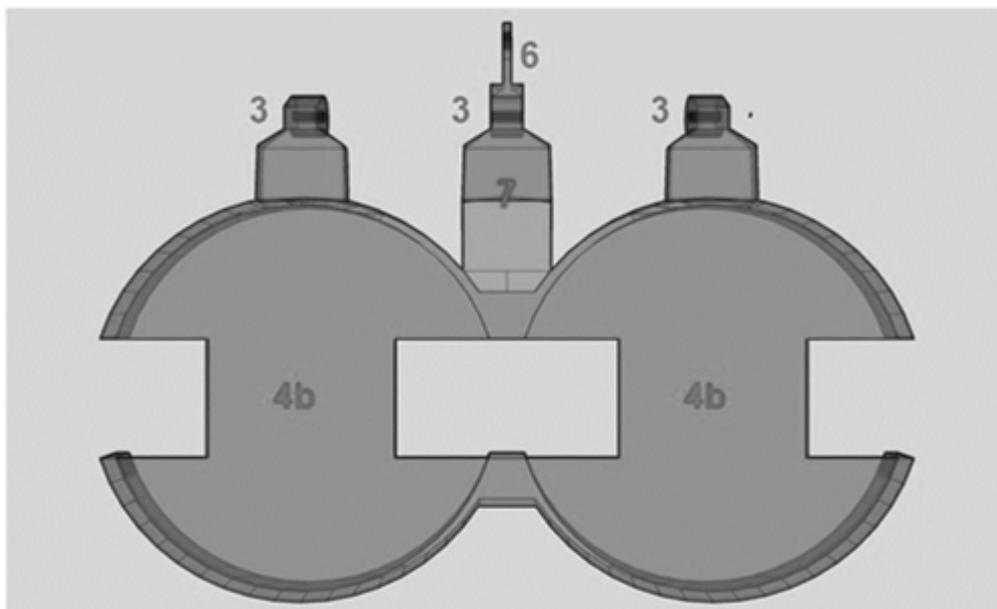


Figura 2

[044] Para facilitar a compreensão, a Figura 3 traz a vista isométrica da estrutura montada. O dito dispositivo deve apresentar dimensões totais de 169,1mm a 209,1 mm de largura, 161,2 a 201,2 mm de altura e 23,7 a 43,7 mm de comprimento (Figura 4). As Figuras 5 e 6 representam os acessórios estruturais que auxiliam o funcionamento do equipamento: link de atuação (8) entre servo-motor (2) e suporte de tampa das placas de Petri (4b) e suporte para o sensor LDR (9).

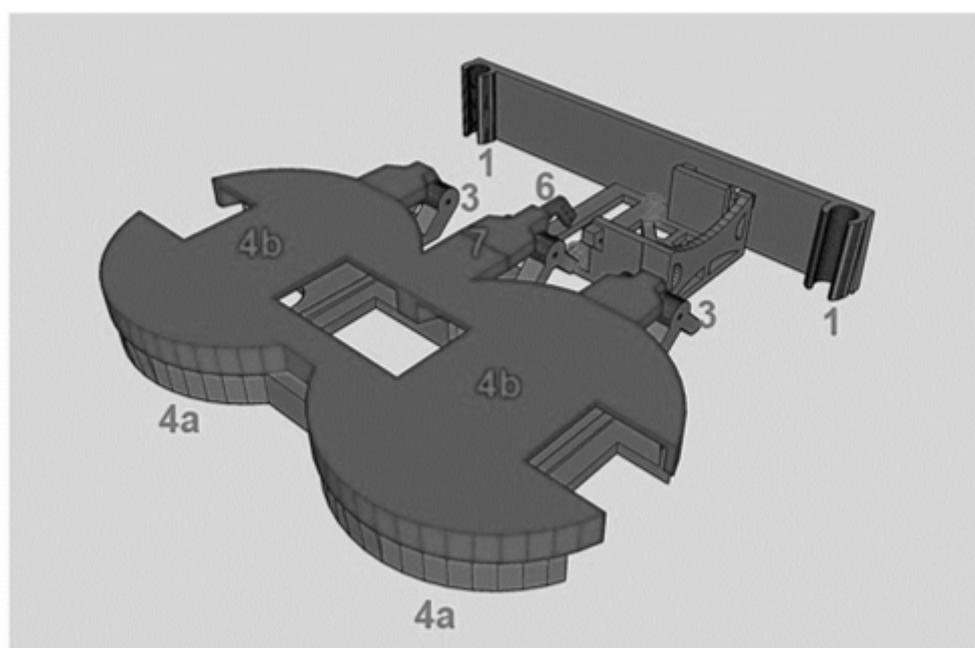


Figura 3

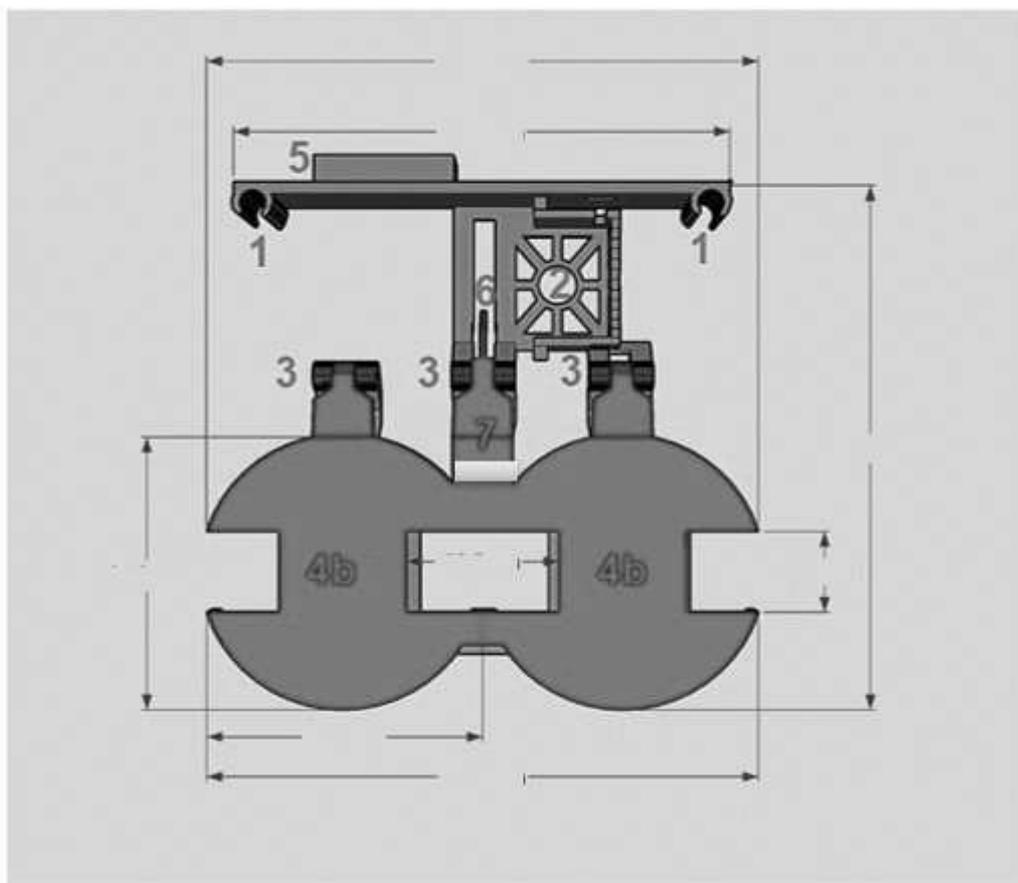


Figura 4

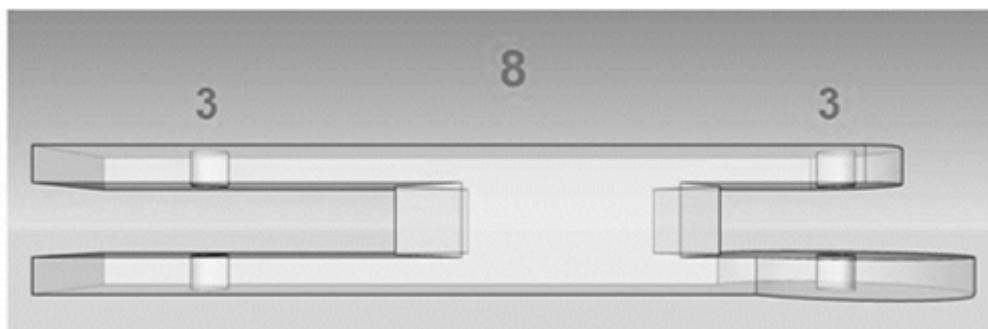


Figura 5

[045] Em relação a eletrônica do dispositivo, e para seu perfeito funcionamento, deve ser preferencialmente composta por um servo-motor (13), mais especificamente compostos por um atuador angular eletromecânico com torque de 3,8 kg a 4.8 V de tensão de alimentação, velocidade de atuação 0,21s/60° a 4.8V, peso de 38 g, acionamento e controle por Pulse-width modulation (PWM); um sistema de radiocomunicação (rx/tx) (12) com operação na frequência de 2,4 GHz com 6 canais (somente na versão com

acionamento por rádiocontrole externo); um microcontrolador Arduino nano (11); e, um sensor de luz LDR com diâmetro preferencial de 3mm (10).

[046] Para o acionamento do servo-motor (2) responsável por abrir e fechar os suportes das tampas das placas de Petri (4b) em ângulo preferencial de 90°, há duas maneiras, denominadas aqui de C e D. A maneira C é preferencialmente via placa microcontroladora arduino nano que é conectada ao servo-motor do dito dispositivo e alimentada pela carga de bateria da própria ARP (conforme exemplificado na Figura 7). Através de um sensor fotossensível (LDR) (10), Figura 6, acoplado ao sistema de luzes de navegação da ARP é possível então realizar a leitura do estado de funcionamento das luzes e comandar o acionamento do servo-motor do dito dispositivo, abrindo o dispositivo (luz acesa) ou fechando o dispositivo (luz apagada); A segunda maneira, D, é preferencialmente via rádio-controle externo, onde é conectado ao servo-motor do dito dispositivo um sistema de radiocomunicação (rx/tx) alimentado pela carga da bateria da ARP, ajustado ao canal de frequência específica do stick do controle remoto (conforme exemplificado na Figura 8). Com isso, ao comandar os movimentos do stick (para cima e para baixo) o sinal é transmitido para o receptor embarcado no equipamento que acionará o servo-motor abrindo o dispositivo (stick para cima) e fechado o dispositivo (stick para baixo).

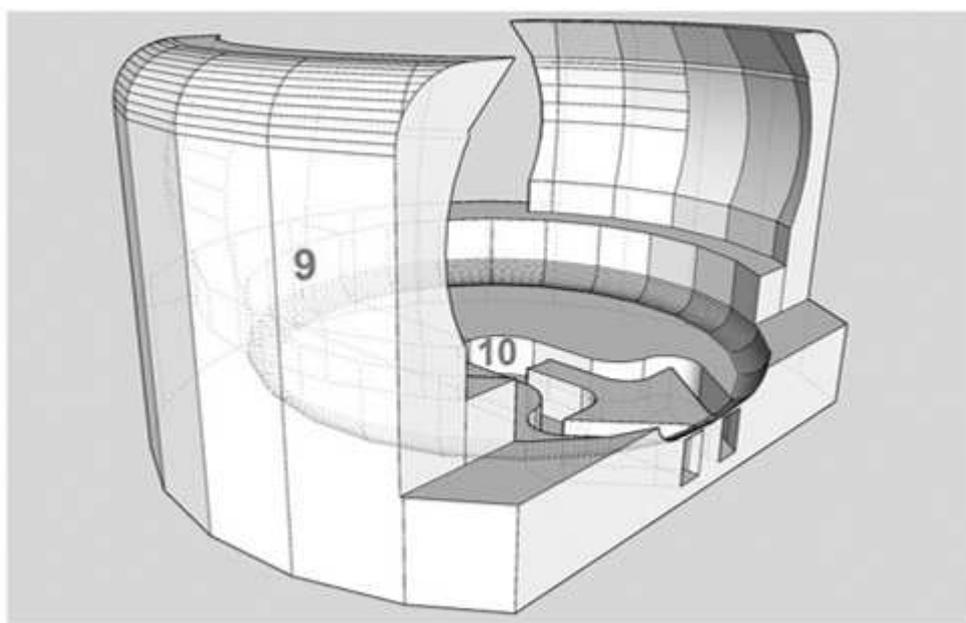


Figura 6



Figura 7

[047] Nas Figuras 7 e 8 são ilustradas a placa microcontroladora Arduino nano (11) e o sistema de radiocomunicação (rx/tx) 2,4GHz (12), respectivamente.



Figura 8

[048] Por fim, na Figura 9 é ilustrada uma representação do servo-motor eletromecânico de atuação angular.



Figura 9

[049] Após revelada com detalhes toda a invenção, bem como as vantagens apresentadas pela mesma, deve, entretanto, mais uma vez ficar claro, que a invenção não está limitada à concretização revelada, pois aqueles com habilidades na técnica irão imediatamente perceber que alterações e substituições podem ser feitas dentro deste conceito inventivo aqui descrito. Desta forma, não pode de forma alguma ser considerada como limitante da invenção, a qual está limitada ao escopo das reivindicações que seguem.