

Gli esseri umani differiscono nella loro nuvola microbica personale

James F. Meadow^{1,2}, Adam E. Altrichter^{1,2}, Ashley C. Bateman^{1,2}, Jason Stenson^{1,3}, GZ Marrone^{1,3}, Jessica L. Green^{1,2,4}, Brendan JM Bohannon^{1,2}

Publicato il 22 settembre 2015

1. Scarica [un'infografica che](#) riassume lo studio.

PubMed [26417541](#)

Informazioni sull'autore e sull'articolo

Astratto

La dispersione dei microbi tra l'uomo e l'ambiente costruito può avvenire attraverso il contatto diretto con le superfici o attraverso il rilascio per via aerea; quest'ultimo meccanismo rimane scarsamente compreso. Gli esseri umani emettono fino a 10⁶ particelle biologiche all'ora e da tempo si sa che trasmettono agenti patogeni ad altri individui e alle superfici interne. Tuttavia non è stato precedentemente dimostrato che gli esseri umani emettano una nube microbica rilevabile nell'aria interna circostante, né se tali nuvole siano sufficientemente differenziate da consentire l'identificazione dei singoli occupanti. Abbiamo utilizzato il sequenziamento ad alto rendimento dei geni rRNA 16S per caratterizzare il contributo batterico disperso nell'aria di una singola persona seduta in una camera climatica sperimentale personalizzata igienizzata. Lo abbiamo confrontato con l'aria campionata in una camera adiacente, identica e non occupata, nonché con le fonti di aria di alimentazione e di scarico. Inoltre, abbiamo valutato le comunità microbiche nelle particelle sedimentate che circondano ogni occupante, per studiare il potenziale destino a lungo termine delle emissioni microbiche nell'aria. La maggior parte degli occupanti potrebbe essere chiaramente rilevata dalle loro emissioni di batteri nell'aria, così come dal loro contributo alle particelle sedimentate, entro 1,5-4 h. Le nubi batteriche degli occupanti erano statisticamente distinte, consentendo l'identificazione di alcuni singoli occupanti. I nostri risultati confermano che uno spazio occupato è microbicamente distinto da uno non occupato e dimostrano per la prima volta che gli individui rilasciano la propria nuvola microbica personalizzata.

Citalo come

Meadow JF, Altrichter AE, Bateman AC, Stenson J, Brown G, Green JL, Bohannon BJM. 2015 . Gli esseri umani differiscono nella loro nuvola microbica personale . *PeerJ* 3 : e1258 <https://doi.org/10.7717/peerj.1258>

Testo dell'articolo principale

introduzione

Gli esseri umani ospitano diversi assemblaggi microbici dentro e sui nostri corpi ([HMP Consortium, 2012](#)), e questi batteri distintamente associati all'uomo possono essere facilmente rilevati all'interno degli edifici su superfici, nella polvere e come bioaerosol ([Hospodsky et al., 2012](#) ; [Täubel et al. al., 2009](#) ; [Fierer et al., 2010](#) ; [Flores et al., 2011](#) ; [Flores et al., 2013](#) ; [Meadow et al., 2013](#) ; [Kembel et al., 2012](#) ; [Kembel et al., 2014](#)). I batteri associati all'uomo si disperdono all'interno e in tutto l'ambiente costruito mediante tre meccanismi primari: (1) contatto umano diretto con superfici interne; (2) emissione di particelle di bioaerosol dal nostro respiro, vestiti, pelle e capelli; e (3) risospensione della polvere interna contenente cellule epiteliali umane, capelli e altre particelle cariche di batteri precedentemente sparse. Recenti studi sui microbi dell'ambiente costruito si sono concentrati in gran parte sul contatto umano diretto con le superfici e hanno dimostrato che le persone possono lasciare tracce batteriche indicative di particolari parti del corpo e tipi di contatto corporeo ([Flores et al., 2011](#) ; [Flores et al., 2013](#) ; [Meadow et al., 2014](#)). Data l'identificabilità a lungo termine del microbioma umano ([Franzosa et al., 2015](#)), in alcuni casi questi assemblaggi batterici possono anche essere ricondotti a una singola persona ([Fierer et al., 2010](#)), sebbene ciò sia stato dimostrato solo utilizzando il contatto diretto.

I bioaerosol (particelle biologiche aerodisperse, inclusi batteri e particelle cariche di batteri) sono stati spesso al centro degli studi sul controllo delle infezioni, ma il loro ruolo nella semina del microbioma dell'ambiente costruito è poco compreso. La ricerca sui bioaerosol fino ad oggi si è concentrata raramente sull'emissione diretta di bioaerosol da fonti umane, perché è difficile districare l'emissione diretta dalla risospensione della polvere osservando ([Meadow et al., 2013](#) ; [Qian et al., 2012](#) ; [Qian, Peccia & Ferro, 2014](#) ; [Nazaroff, 2014](#) ; [Hospodsky et al., 2014](#) ; [Bhangar et al., 2015](#) ; [Adams et al., 2015](#)). I precedenti tentativi di tenere conto della risospensione della polvere nei bioaerosol interni indicano che l'emissione umana attiva, al contrario del particolato risospeso, è una parte sottovalutata della piscina batterica aerodispersa totale negli edifici ([Qian, Peccia & Ferro, 2014](#)). Ad esempio, diversi studi recenti ([Hospodsky et al., 2012](#) ; [Hospodsky et al., 2014](#) ; [Bhangar et al., 2015](#) ; [Adams et al., 2015](#)) hanno rilevato anche concentrazioni di particelle sostanziali da un gruppo di occupanti in una stanza come singolo occupante in una stanza, anche dopo aver controllato la polvere risospesa. Poiché gli esseri umani perdono circa 10^6 particelle (diametro > 0,5 μm) all'ora ([You et al., 2013](#) ; [Bhangar et al., 2015](#)), e molti di questi probabilmente contengono batteri, si ritiene che il contributo microbico umano diffuso attivamente svolga un ruolo sostanziale nella semina del microbioma dell'ambiente costruito. Inoltre, i microbi degli occupanti di una nuova casa possono essere rilevati all'interno della casa in pochi giorni ([Lax et al., 2014](#)), illustrando l'entità del flusso aereo dagli esseri umani al loro ambiente costruito. Questo flusso potenzialmente media anche le interazioni con altri esseri umani e il loro microbiota associato entro l'intervallo di dispersione.

Le interazioni umane con microbi aerodispersi interni sono state studiate per più di un secolo ([Tyndall, 1881](#) ; [Carnelley, Haldane & Anderson, 1887](#) ; [Tyndall, 1876](#)),

sebbene quasi esclusivamente dal punto di vista della malattia e della trasmissione aerea di patogeni ([Noble et al., 1976](#) ; [Sherertz, Bassetti & Bassetti-Wyss, 2001](#) ; [Tang et al., 2011](#)). Le interazioni umane con microbi non patogeni hanno recentemente ricevuto maggiore attenzione per il loro ruolo fondamentale nella funzione umana sana ([HMP Consortium, 2012](#)). Stiamo appena iniziando a capire come queste interazioni strutturano il microbioma umano, comprese le interazioni con bioaerosol indoor e polvere indoor ([Fujimura et al., 2010](#) ; [Fujimura et al., 2013](#)). È plausibile che l'emissione diretta di cellule batteriche da un individuo si traduca in un segnale rilevabile del microbioma umano che è riconducibile a un particolare individuo, simile a quanto riportato dopo il contatto con superfici interne ([Fierer et al., 2010](#)), sebbene ciò non sia mai stato dimostrato. I bioaerosol emessi di recente rappresentano potenzialmente un pool di sorgenti microbiche distinto se contengono taxa batterici che non sono in grado di persistere nella polvere essiccata o sulle superfici e quindi potrebbero non essere rilevati in altro modo. Questi microbi emessi di recente potrebbero anche colonizzare più facilmente altri esseri umani all'interno dell'ambiente costruito rispetto a quelli che si trovano sulle superfici o nella polvere risospesa, poiché i microbi emessi di recente hanno maggiori probabilità di essere fisiologicamente attivi e non sono stati soggetti a essiccazione prolungata o esposizione ai raggi UV prima che la colonizzazione possa verificarsi con successo.

Al fine di comprendere il contributo umano ai bioaerosol all'interno degli ambienti costruiti e la misura in cui questo pool di bioaerosol emesso contribuisce al segnale microbico umano residuo rilevato nella polvere interna e sulle superfici interne circostanti, abbiamo caratterizzato la nube batterica aerea di una persona seduta in una camera climatica sperimentale igienizzata ([Fig. S1](#)). La biomassa batterica di fondo nella camera è stata ridotta da una combinazione di disinfezione delle superfici e controllo della ventilazione. Nel corso di due esperimenti separati, abbiamo utilizzato metodi di sequenziamento del DNA ad alto rendimento per caratterizzare la composizione della comunità batterica nell'aria emessa da 11 diversi occupanti umani. Durante il primo esperimento, abbiamo confrontato gli assemblaggi di batteri trasportati dall'aria con quelli rilevati simultaneamente in un lato identico, adiacente e non occupato della camera. Questo è stato ripetuto per tre persone diverse, ciascuna per periodi di campionamento di 4 e 2 ore. Per valutare la possibilità che queste particelle sospese nell'aria producano un segnale rilevabile del microbioma umano come polvere depositata sulle superfici circostanti, abbiamo sequenziato il DNA dai piatti di sedimentazione in ogni periodo di campionamento e li abbiamo confrontati con i raggruppamenti nell'aria. Dato che gli occupanti potevano essere chiaramente rilevati e differenziati l'uno dall'altro, abbiamo progettato un secondo esperimento per esplorare ulteriormente la distinguibilità della nuvola microbica personale. Per questo abbiamo campionato 8 persone diverse per 90 minuti ciascuna e con un flusso d'aria a 1 cambio d'aria all'ora (ACH) e 3 ACH. Le emissioni microbiche personali di ciascun occupante sono state confrontate tra gli occupanti e con l'aria di alimentazione e di scarico filtrata dalla camera occupata per valutare la rilevabilità personale all'interno del sistema di ventilazione di un edificio.

Metodi e materiali

Design sperimentale

Tutti i campioni sono stati raccolti dal 5 al 7 dicembre 2012 (primo esperimento) e dal 22 aprile al 3 maggio 2013 (secondo esperimento) presso l'Energy Studies in Buildings Laboratory, Portland, OR, USA, utilizzando la camera climatica personalizzata ([Fig. S1](#) ; dimensioni interne = circa 3,7 m di lunghezza \times 2,4 m di larghezza \times 2,9 m di altezza; 25,75 m³). L'aria filtrata veniva fornita attraverso un plenum a soffitto e scaricata attraverso un plenum a pavimento. Durante il primo esperimento, il pavimento e le pareti della camera sono stati rivestiti con fogli di plastica da camera bianca da 0,15 mm (Visqueen, British Polythene Ltd., Heanor, Regno Unito). Il rivestimento era antistatico e ignifugo ed è stato lavato e confezionato in doppio imballo dai produttori. I bordi delle lastre sono stati sigillati su pareti, pavimenti e soffitti con nastro in vinile per camera bianca (UltraTape, Wilsonville, Oregon, USA). Una partizione verticale di fogli di plastica è stata fissata al centro della camera per creare due camere identiche per il campionamento simultaneo. Questo progetto simultaneo ci ha permesso di monitorare eventuali cambiamenti nell'aria della camera non dovuti all'occupante nel corso del primo esperimento. Durante il secondo esperimento, la plastica non è stata utilizzata, né la camera è stata divisa,

L'aria di alimentazione alimentata da un ventilatore continuo è stata utilizzata per mantenere la pressione positiva nella camera durante entrambi gli esperimenti; ciò ha contribuito a ridurre l'introduzione di bioaerosol di fondo dall'esterno della camera. Aria condizionata interna (primo esperimento) o aria esterna (secondo esperimento) fatta passare attraverso un filtro MERV-15 (primo esperimento) o MERV-8 (secondo esperimento) per ridurre l'introduzione di polvere e batteri nella camera. Tuttavia, la canalizzazione non è stata sterilizzata dopo il punto di filtrazione, né l'apparecchiatura meccanica in linea. Pertanto, la camera non era completamente sigillata all'aria non filtrata. L'aria di mandata canalizzata è stata diffusa attraverso un plenum a soffitto nella camera. L'aria è stata scaricata (secondo esperimento) attraverso il plenum del pavimento sotto la camera e attraverso un condotto di scarico. Durante il secondo esperimento,

I tassi di ricambio dell'aria sono stati monitorati in entrambi gli esperimenti bilanciando le velocità dell'aria di alimentazione e di scarico, misurate nel punto centrale del condotto con un misuratore di ventilazione multifunzione e una sonda termoanemometrica (rispettivamente # 9555 e # 964; TSI Incorporated, Shoreview, MN). La pressione dell'aria all'interno della camera è stata misurata con un trasduttore di pressione differenziale dell'aria (# T-VER-PXU-L; Onset Computer Corporation, Bourne, Massachusetts, USA).

Tutte le superfici interne della camera, compreso il rivestimento in plastica e gli apparati di campionamento, sono state lavate con un trattamento chimico battericida (Cavicide, Metrex Research, Orange, California, USA) prima e tra ogni prova sperimentale per ridurre la carica microbica nella camera e per limitare la contaminazione incrociata tra i

trattamenti degli occupanti. Le sedie degli occupanti utilizzate in entrambi gli esperimenti erano sedie impilabili Caper (set Flexnet, braccioli fissi, ruote con pavimento duro; Herman Miller, Zeeland, Michigan, USA). Tutto il personale tecnico che entrava nella camera per la pulizia o la raccolta dei campioni indossava indumenti Tyvek sterili con cappuccio, guanti e maschere facciali.

Tutti gli undici soggetti erano privi di sintomi di malattia al momento del campionamento, non avevano assunto antibiotici per almeno 4 mesi e avevano un'età compresa tra 20 e 33 anni. I soggetti sono stati informati della natura e del disegno dello studio consenso scritto a partecipare. Tutti i protocolli di ricerca sono stati approvati dal Consiglio di revisione istituzionale dell'Università dell'Oregon (protocollo n. 03172014.021). Le identità dei partecipanti non sono mai state registrate su campioni o nei set di dati risultanti.

Protocolli standard di campionamento di bioaerosol e particelle sedimentate utilizzati da [Bowers et al. \(2011\)](#), [Bowers et al. \(2012\)](#) e [Adams et al. \(2013\)](#) sono state modificate per il nostro approccio sperimentale della camera climatica. Ogni occupante sedeva su una sedia a rotelle di plastica disinfettata circondata da 12 filtri d'aria sterili in nitrato di cellulosa da 0,2 μm disposti equidistanti dal sedile ([Fig. S1](#)). I filtri dell'aria sono stati disposti in anelli di 6 campionatori ciascuno: un anello all'altezza delle spalle quando si è seduti (1 m) e l'altro appena sopra l'altezza del pavimento (15 cm). Durante il secondo esperimento, un anello di 6 filtri è stato posizionato all'altezza delle spalle, ma non all'altezza del pavimento. L'aria veniva aspirata attraverso i filtri da una pompa esterna alla camera a c. 10 L min⁻¹ per il primo esperimento e c. 24,5 L min⁻¹ per il secondo. Le particelle sedimentate sono state raccolte sia sul coperchio che sulla base di 6 piastre di Petri vuote e sterili (15 cm) che sono state posizionate a faccia in su sul pavimento in uno schema circolare che circonda l'occupante. Al fine di esporre ciascun filtro dell'aria all'occupante in modo simile, l'occupante è stato istruito a ruotare di circa 60 ° a intervalli regolari per affrontare un nuovo filtro o una coppia di filtri; gli occupanti erano seduti su sedie a rotelle, quindi la rotazione richiedeva un movimento minimo all'interno della camera. La camera non occupata era disposta in modo identico, con l'eccezione che all'occupante della camera occupata era consentito un laptop sterilizzato in superficie con etanolo per l'intrattenimento e come mezzo per comunicare con coloro che erano fuori dalla camera; al fine di ridurre il calore generato dal computer portatile, gli occupanti hanno tenuto il laptop su una superficie gommata, scrivania da viaggio sterilizzata in superficie. Il portatile e la scrivania da giro erano assenti dalla camera non occupata.

Gli occupanti si sono auto-riferiti il loro comfort e qualsiasi regolazione della temperatura necessaria è stata effettuata senza temperare l'aria, ma piuttosto regolando la temperatura del pavimento radiante. La temperatura dell'aria e l'umidità relativa sono state monitorate mediante data logger (# U12-012; Onset Computer Corporation, Bourne, Massachusetts, USA). Le temperature all'interno della camera climatica durante entrambi gli esperimenti erano comprese tra 22 e 26 ° C e l'umidità relativa tra il 25 e il 45%.

Durante il primo esperimento, ogni giorno consisteva in un singolo occupante nella camera per un periodo di campionamento di 240 e uno di 120 minuti, con una pausa tra i periodi di campionamento. Durante il secondo esperimento, ogni occupante è rimasto nella camera per due periodi separati di 90 minuti, una volta a 3 cambi d'aria all'ora (ACH) velocità di ventilazione e di nuovo per 1 ACH.

I dati sul conteggio delle particelle sono stati raccolti a una velocità di $2,83 \text{ L min}^{-1}$ in intervalli di 1 minuto e le dimensioni sono state frazionate con l'AeroTrack 9306-V2 (TSI Inc., Shoreview, Minnesota, USA). Per questo studio sono state prese in considerazione tre diverse classi di dimensioni delle particelle ($2,5\text{--}5 \mu\text{m}$, $5\text{--}10 \mu\text{m}$ e $10 + \mu\text{m}$). Tutti i conteggi delle particelle sono stati mediati su intervalli di 10 min (5 per il secondo esperimento) e convertiti nel rapporto L min^{-1} sopra i valori non occupati simultanei per il primo esperimento. Poiché nel secondo esperimento non è stata utilizzata alcuna camera non occupata, abbiamo calcolato un coefficiente di perdita di deposizione di particelle ([Tracy et al., 2002](#)) confrontando i conteggi di particelle nella camera occupata con i conteggi di particelle nel sistema di condotti di alimentazione. I filtri e le piastre di decantazione sono stati immediatamente confezionati, trasportati su ghiaccio secco e conservati a -80°C fino all'ulteriore lavorazione.

Preparazione e sequenziamento della libreria 16S

Per evitare effetti di confusione introdotti durante la preparazione della libreria, tutti i campioni sono stati randomizzati in batch di estrazione, batch di amplificazione e ordine di elaborazione. I filtri dell'aria e i piatti di sedimentazione di entrambi gli esperimenti sono stati tutti elaborati utilizzando metodi specifici per campioni a bassa biomassa adattati da [Kwan et al. \(2011\)](#) e le librerie di ampliconi sono state costruite seguendo i metodi di [Caporaso et al. \(2012\)](#) e [Fadrosh et al. \(2014\)](#).

Primo esperimento

Le particelle e gli acidi nucleici dal coperchio e dalla base di ciascun piatto di sedimentazione sono stati raccolti e combinati utilizzando un tampone di cotone inumidito con PBS e privo di DNA (Cat.25-806 1WC FDNA; Puritan Medical, Guilford, Maine, USA) per pulire il coperchio e basare due volte su ciascuna, in direzioni perpendicolari e ruotando il tampone di un quarto di giro ad ogni passaggio. Le cellule e gli acidi nucleici sono stati quindi eluiti dai filtri dell'aria e dai tamponi agitando su vortex ciascun campione in 4 mL di PBS sterile (grado biotecnologico; Amresco, Solon, Ohio, USA). L'eluato è stato successivamente concentrato a circa $500 \mu\text{L}$ in un filtro centrifugo Amicon Ultra-4 (30 kDa). $200 \mu\text{L}$ di questo campione concentrato sono stati estratti utilizzando il kit MoBio htp-PowerSoil DNA Isolation secondo le specifiche del produttore con le seguenti modifiche:

Le librerie di sequenziamento sono state preparate utilizzando una modifica del documento [Caporaso et al. \(2012\)](#) protocollo in cui i primer del gene rRNA 16S 515F e 806R con codice a barre Golay sono stati utilizzati in PCR triplicate per campione, seguiti da una combinazione equivalente di tutti i campioni e concentrati a $25 \mu\text{L}$ (Zymo Research Clean and Concentrate-5). Questa è stata seguita dalla selezione della

dimensione dell'elettroforesi su gel e dall'estrazione dei campioni raggruppati (Qiagen MinElute Gel Extraction), con una fase di pulizia finale (Zymo Research Clean and Concentrate-5). La PCR aveva i seguenti componenti (25 μ l di volume totale): 13,25 μ l di acqua per DNA, 5 μ l di tampone 5 \times HF, 0,5 μ l di dNTP (10 mM), 0,5 μ l ogni primer (10 μ M), 0,25 μ l di Phusion Hot Start II polimerasi (2 U / μ l) e 5 μ l di stampo di DNA genomico. La PCR è stata eseguita nelle seguenti condizioni: una fase di denaturazione iniziale di 98 ° C per 1 min, seguita da 35 cicli di 98 ° C per 20 s, 52 ° C per 30 s e 72 ° C per 30 s, con un'estensione finale a 72 ° C per 10 min. La libreria finale è stata quindi inviata al Dana-Farber Cancer Institute Molecular Biology Core Facilities per il sequenziamento di 250 PE sulla piattaforma Illumina MiSeq.

Secondo esperimento

I campioni d'aria del secondo esperimento sono stati elaborati utilizzando le seguenti modifiche al kit MoBio PowerSoil-htp: i filtri sono stati battuti con le sfere per 1,5 minuti alla massima velocità con l'omogeneizzatore FastPrep1200 e riscaldati per 10 minuti a 65 ° C, le soluzioni C2 e C3 sono state omesse prima del caricamento sulla colonna centrifuga, i campioni sono stati eluiti in 70 μ l.

Ogni campione è stato amplificato con un metodo di preparazione PCR a 2 fasi per il sequenziamento Illumina della regione V3-V4 con primer a doppia indicizzazione 319F e 806R inclusi spaziatori di eterogeneità per migliorare le librerie a bassa plessità, simili ai metodi utilizzati da Fadrosch e colleghi ([2014](#)). La PCR1 è stata eseguita in triplicato per ciascun campione e includeva 11,75 μ L di acqua per PCR, 0,25 μ L di Phusion HS II polimerasi (2 U / μ L), 5 μ L di tampone 5 \times HF, 0,5 μ L di dNTP, 2,5 μ L di miscela di primer per geni diretti e inversi (5 μ M ciascuno) con spaziatori di eterogeneità e 5 μ L di DNA genomico stampo. La PCR1 è stata eseguita nelle seguenti condizioni: 98 ° C per 2 min, seguita da 25 cicli di 98 ° C per 20 s, 50 ° C per 30 s e 72 ° C per 30 s, con un'estensione finale di 2 min a 72 ° C. I triplicati sono stati raggruppati e puliti con il kit di purificazione PCR Qiagen MinElute 96 UF prima della PCR2. PCR2 conteneva 6,75 μ L di acqua per PCR, 0,25 μ L Phusion HS II polimerasi (2 U / μ L), 5 μ L di tampone 5x HF, 0,5 μ L dNTP, 1,25 μ L di primer forward e reverse (10 μ M ciascuno) con adattatore Illumina e sequenze indice e 10 μ l di templatato dai prodotti PCR1 puliti. La PCR2 è stata eseguita nelle seguenti condizioni: 98 ° C per 1 min, seguita da 10 cicli di 98 ° C per 20 s, 63 ° C per 30 s e 72 ° C per 30 s, con un'estensione finale di 3 min a 72 ° C. I campioni sono stati quindi puliti, multiplexati e concentrati per essere analizzati su un gel all'1% per la selezione delle dimensioni, quindi sono stati sottoposti a una fase di pulizia finale con il kit Zymo Research Clean e Concentrate-25. La libreria finale è stata inviata per la corsa di sequenziamento 300 PE sulla piattaforma MiSeq Illumina presso il Molecular Biology Core Facility presso il Dana Farber Cancer Institute di Harvard.

Elaborazione dati e analisi statistica

Le sequenze grezze del primo esperimento sono state elaborate utilizzando una pipeline QIIME v. 1.7 ([Caporaso et al., 2010](#)). Abbiamo mantenuto e demultiplicato $1,007 \times 10^7$ sequenze con un punteggio di qualità medio di 30 oltre il 97% della lunghezza della sequenza. Le sequenze sono state raggruppate in OTU con una somiglianza del 97%

utilizzando il clustering denovo UCLUST ([Edgar, 2010](#)), che ha portato a c. $2,4 \times 10^5$ OTU su 300 campioni. Le sequenze non elaborate del secondo esperimento sono state elaborate utilizzando la pipeline QIIME v. 1.8, tranne per il fatto che le OTU sono state raggruppate utilizzando USEARCH v. 7 ([Edgar, 2013](#)). Abbiamo mantenuto e demultiplato $7,5 \times 10^7$ sequenze con tassi di errore attesi inferiori a 0,5. La tassonomia è stata assegnata alle OTU utilizzando il classificatore RDP e il core set della versione Greengenes "4feb2011" ([DeSantis et al., 2006](#)).

1

Dopo il filtraggio di qualità, il demultiplexing e il clustering OTU, tutte le analisi statistiche sono state condotte in R ([R Development Core Team, 2010](#)), principalmente con i pacchetti vegan, labdsv e ape ([Oksanen et al., 2011](#) ; [Roberts, 2010](#) ; [Paradis, Claude & Strimmer, 2004](#)). Le sequenze di cloroplasti vegetali e mitocondriali sono state rimosse da entrambi i set di dati prima dell'analisi. I contaminanti apparenti sono stati anche analizzati separatamente per la loro influenza sui risultati, e quelli che esercitavano influenza sono stati rimossi dall'analisi a valle (4 OTU dal primo esperimento e 10 dal secondo).

Primo esperimento

Tutti i campioni nel primo esperimento sono stati rarefatti a 1.000 sequenze per campione per ottenere una profondità di campionamento approssimativamente uguale. La β - diversità è stata calcolata utilizzando la metrica tassonomica di Canberra e le ordinazioni sono state costruite utilizzando il ridimensionamento multidimensionale non metrico iterativo (NMDS). Le differenze nella comunità sono state valutate utilizzando l'analisi multivariata permutazionale della varianza (PERMANOVA). Poiché le differenze di comunità sono state testate con test permutazionali, riportiamo i valori di p fino a, ma non al di sotto, 0,001. Il raggruppamento è stato condotto con un metodo di collegamento medio basato sulle distanze di Canberra. L'analisi delle specie [indicatrici](#) ha seguito [Dufrêne & Legendre \(1997\)](#) e le OTU sono state ulteriormente studiate se p non corretto-i valori erano inferiori a 0,05. Gli indicatori OTU più significativi dai filtri dell'aria di 4 ore (valore dell'indicatore > 0,6 e valore p < 0,001) sono mostrati nella [Tabella S1](#) . Le sequenze rappresentative di ciascuna OTU sono state sottoposte a BLAST rispetto al database degli isolati NCBI 16S, risultando in presunte assegnazioni di specie e numeri di adesione all'NCBI.

Secondo esperimento

L'obiettivo della seconda analisi era diverso dalla prima. Eravamo principalmente interessati al sottoinsieme di OTU che aiutano a distinguere ogni occupante, e non alle OTU che erano abbondanti sia nell'aria libera che nell'aria occupata. Questi mirato OTU sono stati selezionati in base alle loro GreenGenes assegnazioni tassonomiche: *Corynebacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Propionibacteriaceae*, *peptostreptococcaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Aerococcaceae* e *Tissierellaceae*. Pertanto non abbiamo rarefatto il secondo set di dati, ma piuttosto creato un sottoinsieme di abbondanze relative per l'analisi. Inoltre, poiché molti di questi gruppi associati all'uomo erano i più abbondanti e distinti tra gli occupanti, abbiamo utilizzato la metrica di dissimilarità di Bray-Curtis per le analisi

multivariate e la distanza di Jaccard (come percentuale di OTU condivise) per mostrare le relazioni condivise medie in [Fig. S4](#) . Poiché le differenze di comunità sono state testate con test permutazionali, riportiamo i valori di p fino a, ma non al di sotto, 0,001. Il raggruppamento è stato condotto con il metodo di collegamento di Ward basato sulle differenze di Bray-Curtis.

Disponibilità di dati e analisi

Tutti i dati grezzi della sequenza sono disponibili nel repository di dati ad accesso aperto di Figshare sotto DOI: [10.6084 / m9.figshare.1506779](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.1506779) . Tutti i dettagli dell'analisi dei dati e gli script R sono disponibili su GitHub: https://github.com/jfmeadow/Meadow_HumanMicrobialCloud_Analysis .

Risultati

Il sequenziamento dei geni rRNA 16S batterici nei due esperimenti ha prodotto sequenze filtrate di qualità superiore a 14×10^6 . Poiché l'obiettivo del primo esperimento era quello di determinare la rilevabilità di un singolo occupante in una stanza pulita, ci siamo prima concentrati sulla differenziazione dell'aria occupata da quella non occupata.

Gli occupanti umani perdono una nube batterica rilevabile

Nel primo esperimento, gli assemblaggi batterici nei campioni di aria occupata e non occupata erano significativamente differenti, indipendentemente dall'occupante, dal metodo di raccolta o dalla durata della prova ($p = 0,001$; dai test PERMANOVA su distanze di Canberra; [Tabella 1](#)). Quando si considerano i periodi di campionamento individuali ([Tabella 2](#) e [Fig. 1](#)), tutti e tre gli individui potrebbero essere chiaramente rilevati sopra le comunità aeree di fondo dopo 4 e 2 ore dai batteri presenti nell'aria raccolti sui filtri dell'aria. Solo i soggetti 1 e 3 erano rilevabili in modo coerente dalle particelle nei piatti di sedimentazione ad entrambi gli intervalli di tempo; Il soggetto 2 era rilevabile in modo significativo durante il periodo di campionamento di 4 ore, ma non durante il periodo di campionamento di 2 ore ($p = 0,34$).

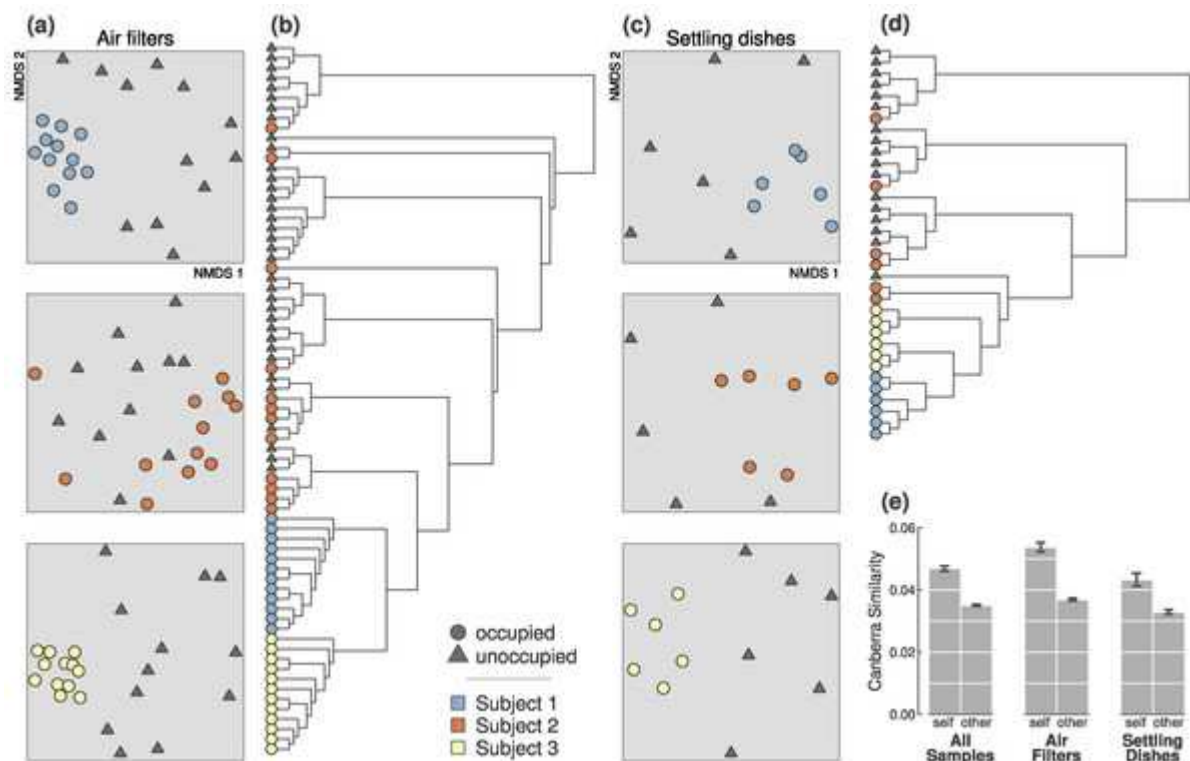


Figura 1: I bioaerosol occupati e non occupati durante il primo esperimento erano significativamente differenti e gli occupanti erano distinguibili durante tutti i periodi di campionamento di 4 ore.

(A) Tutti e tre gli occupanti erano distinguibili dall'aria contemporaneamente non occupata (tutti i valori $p = 0,001$). I grafici di ordinazione sono NMDS bidimensionali dalle distanze di Canberra. (B) Gli occupanti erano distinguibili l'uno dall'altro in base ai batteri raccolti nei filtri dell'aria (valore $p = 0,001$). (C) Gli occupanti erano distinguibili da campioni non occupati sulla base di batteri raccolti in piatti di sedimentazione (valori $p = 0,003, 0,044$ e $0,005$; per i soggetti 1, 2 e 3). (D) Le particelle depositate da ciascun occupante erano in qualche modo meno identificabili in modo coerente, anche se i tre occupanti erano significativamente diversi (p -valore = $0,001$). (E) Le nuvole microbiche occupanti erano più simili ad altri campioni della stessa persona che ad altri occupanti, indipendentemente dal metodo di campionamento. Questa differenza era significativamente più pronunciata di quella dei campioni non occupati prelevati simultaneamente durante i periodi di campionamento (Fig. S1). Le barre di errore rappresentano ± 1 errore standard sulle somiglianze di Canberra a coppie.

[Scarica l'immagine a dimensione intera](#)

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/fig-1)

Tabella 1:

Durante il primo esperimento, le camere occupate erano significativamente diverse da quelle non occupate per ogni periodo di campionamento di 4 ore, indipendentemente dal metodo di campionamento.

I test per "occ vs. unocc" considerano due gruppi diversi, combinando tutti i campioni occupati e tutti i campioni non occupati, mentre "3 persone vs unocc" considera 4 gruppi diversi, inclusi 3 occupanti separati e tutti i campioni non occupati insieme.

| Sottoinsieme di dati | Test | <i>n</i> | <i>R</i> ² | <i>p</i> ^a |
|----------------------|---------------|----------|-----------------------|-----------------------|
| Tutti i campioni | Occ vs. unocc | 21 1 | 0,01 | 0.001 |
| Tutto 4 ore | Occ vs. unocc | 10 | 0.017 | 0.001 |

| Sottoinsieme di dati | Test | <i>n</i> | <i>R</i> ² | <i>p</i> ^a |
|--------------------------------|---------------------|----------|-----------------------|-----------------------|
| | | 6 | | |
| Tutto 2 ore | Occ vs. unocc | 10 5 | 0.014 | 0.001 |
| Tutti i filtri dell'aria | Occ vs. unocc | 14 0 | 0.014 | 0.001 |
| Tutti i piatti di decantazione | Occ vs. unocc | 71 | 0.018 | 0.001 |
| Solo campioni di 4 ore | | | | |
| Filtri dell'aria | Occ vs. unocc | 71 | 0.023 | 0.001 |
| Filtri dell'aria | 3 persone vs. unocc | 71 | 0.061 | 0.001 |
| Filtri dell'aria | Occupanti | 36 | 0,078 | 0.001 |
| Filtri dell'aria | Solo non occupato | 35 | 0.061 | 0.027 |
| Piatti di sedimentazione | Occ vs. unocc | 35 | 0.035 | 0.001 |
| Piatti di sedimentazione | 3 persone vs. unocc | 35 | 0.098 | 0.001 |
| Piatti di sedimentazione | Occupanti | 18 | 0.13 | 0.001 |
| Piatti di sedimentazione | Solo non occupato | 17 | 0.126 | 0.221 |

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / table-1](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/table-1)

Appunti:

a I risultati provengono da PERMANOVA sulle distanze di Canberra.

Queste differenze di comunità erano evidenti in alcuni taxa batterici associati all'uomo. L'analisi degli indicatori ([Dufrêne & Legendre, 1997](#)) identifica quelle unità tassonomiche operative (OTU) che distinguono in modo significativo e coerente un dato trattamento, in questo caso i gruppi batterici che erano particolarmente abbondanti nelle camere occupate o quelli che hanno contribuito a differenziare tra i singoli occupanti. Tutti i taxa indicatori significativi (definiti come aventi un valore dell'indicatore > 0,5 e *p*-valore <0,01) rilevati nei filtri dell'aria a 4 ore dalla camera occupata erano strettamente correlati ai taxa batterici associati all'uomo trovati nel database degli isolati batterici NCBI. Al contrario, tutti i taxa indicatore superiore da campioni non occupati erano correlati a batteri provenienti da ambienti non umani, apparentemente introdotti dall'aria di alimentazione nella camera climatica. Le tasse con valori dell'indicatore > 0,7 sono mostrate nella [tabella 3](#) .

Tavolo 2:

Durante il primo esperimento, gli occupanti erano sempre rilevabili nei filtri dell'aria e generalmente nei piatti di sedimentazione.

| Soggetto | Ore | Tipo di campione | <i>n</i> | <i>R</i> ² | <i>p</i> ^a |
|----------|-----|------------------|----------|-----------------------|-----------------------|
|----------|-----|------------------|----------|-----------------------|-----------------------|

| Soggetto | Ore | Tipo di campione | n | R ² | p ^a |
|----------|-----|------------------------|----|----------------|----------------|
| 1 | 4 | filtro dell'aria | 24 | 0.061 | 0.001 |
| 2 | 4 | filtro dell'aria | 24 | 0.064 | 0.001 |
| 3 | 4 | filtro dell'aria | 23 | 0.051 | 0.001 |
| 1 | 2 | filtro dell'aria | 24 | 0.061 | 0.001 |
| 2 | 2 | filtro dell'aria | 22 | 0,05 | 0.013 |
| 3 | 2 | filtro dell'aria | 23 | 0.049 | 0.006 |
| 1 | 4 | piatto di decantazione | 12 | 0.102 | 0.003 |
| 2 | 4 | piatto di decantazione | 12 | 0.098 | 0.005 |
| 3 | 4 | piatto di decantazione | 11 | 0.105 | 0.044 |
| 1 | 2 | piatto di decantazione | 12 | 0.099 | 0.005 |
| 2 | 2 | piatto di decantazione | 12 | 0.092 | 0.344 |
| 3 | 2 | piatto di decantazione | 12 | 0.097 | 0.012 |

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / tabella-2](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/tabella-2)

Appunti:

a I risultati provengono da PERMANOVA sulle distanze di Canberra.

Tabella 3:

Gli indicatori OTU riflettono il trattamento e i singoli occupanti del primo esperimento.

| Isolamento e adesione NCBI 16S più vicini | Indicatore tipo ^b (e sesso) | Isolare l'ambiente di origine | Somiglianza di sequenza (%) all'isolato NCBI | Valore dell'indicatore | p |
|--|--|-------------------------------|--|------------------------|-------|
| <i>Dolosigranulum pigrum</i> NR_026098.1 | Soggetto 1 (m) | Clinica umana | 99 | 0.95 | 0.001 |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> NR_074986.1 ^a | Soggetto 3 (f) | Vagina umana, intestino | 100 | 0.91 | 0.001 |
| <i>Corynebacterium tuberculostearicum</i> NR_028975.1 ^a | Occupato | Seno umano, pelle | 100 | 0.82 | 0.001 |
| <i>Corynebacterium amycolatum</i> NR_026215.1 ^a | Occupato | Mucoso umano, pelle | 100 | 0.8 | 0.001 |
| <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> NR_042137.1 | Soggetto 1 (m) | Clinica umana | 100 | 0.78 | 0.001 |

| Isolamento e adesione NCBI 16S più vicini | Indicatore tipo ^b (e sesso) | Isolare l'ambiente di origine | Somiglianza di sequenza (%) all'isolato NCBI | Valore dell'indicatore | p |
|--|--|-------------------------------|--|------------------------|-------|
| <i>Dietzia maris</i> NR_037025.1 | Soggetto 1 (m) | Clinica umana | 95 | 0.78 | 0.001 |
| <i>Anaerococcus prevotii</i> NR_074575.1 | Soggetto 3 (f) | Polmone umano, vagina | 100 | 0.78 | 0.001 |
| <i>Corynebacterium mucifaciens</i> NR_026396.1 ^a | Occupato | Ferita umana | 100 | 0.77 | 0.001 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> NR_074995.1 ^a | Occupato | Pelle umana | 100 | 0.77 | 0.001 |
| <i>Facklamia ignava</i> NR_026447.1 | Soggetto 3 (f) | Clinica umana | 100 | 0.75 | 0.001 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NR_074875.1 ^a | Disoccupato | Suolo, acquatico | 100 | 0.73 | 0.001 |
| <i>Streptococcus oralis</i> NR_042927.1 | Occupato | Orale umano | 100 | 0.69 | 0.002 |
| <i>Corynebacterium massiliense</i> NR_044182.1 | Soggetto 1 (m) | Clinica umana | 100 | 0.67 | 0.001 |
| <i>Corynebacterium jeikeium</i> NR_074706.1 ^a | Soggetto 1 (m) | Pelle umana | 100 | 0.66 | 0.001 |
| <i>Peptoniphilus ivorii</i> NR_026359.1 | Soggetto 3 (f) | Clinica umana | 98 | 0.65 | 0.001 |
| <i>Corynebacterium simulans</i> NR_025309.1 | Soggetto 1 (m) | Clinica umana | 99 | 0.64 | 0.001 |
| <i>Corynebacterium riegelii</i> NR_026434.1 | Soggetto 3 (f) | Vagina umana | 99 | 0.63 | 0.001 |
| <i>Peptoniphilus harei</i> NR_026358.1 | Occupato | Clinica umana | 100 | 0.61 | 0.001 |
| <i>Leuconostoc gelidum</i> NR_102984.1 | Soggetto 2 (m) | Alimenti fermentati | 100 | 0.6 | 0.001 |
| <i>Citrobacter freundii</i> NR_028894.1 | Disoccupato | Suolo, acquatico | 100 | 0.6 | 0.003 |

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / tabella-3](https://doi.org/10.7717/peerj.1258)

Appunti:

anche una OTU corrispondente era tra le più abbondanti e quindi inclusa nella [Fig.2](#).

b I singoli occupanti sono mostrati se i taxa dell'indicatore erano significativi per quella particolare persona e " occupati " se significativi per tutti gli occupanti insieme.

Gli occupanti differiscono nella loro nuvola microbica personale

Oltre alla nostra scoperta che gli occupanti erano rilevabili dai loro contributi microbici di bioaerosol e / o particelle sedimentate, anche gli assemblaggi batterici erano *unici* per ciascuno dei tre occupanti, il che significa che i campioni di ogni individuo erano statisticamente distinti e identificabili per quell'occupante ($p = 0,001$; da PERMANOVA su filtri aria di 4 ore da ciascun occupante; [Fig.1](#) e [Tabella 1](#)). Ogni occupante, tuttavia, era identificabile in modi diversi. Ad esempio, gli assemblaggi microbici nei filtri dell'aria dai periodi di campionamento di 4 ore del Soggetto 2 erano statisticamente più variabili rispetto agli altri due occupanti ($p < 0.0001$; da test ANOVA sulle distanze di dispersione beta); il periodo di campionamento di 2 ore ha seguito lo stesso schema generale.

Ciascuno dei tre occupanti era inoltre identificabile da distinti OTU batterici. Ad esempio, un OTU simile al 99% al *Dolosigranulum pigrum* ([Fig. S2](#)) è stato arricchito in modo simile in tutti i campioni del Soggetto 1, ma era assente per gli altri occupanti. I campioni del soggetto 2 erano dominati da uno *Staphylococcus* OTU (100% simile a *Staphylococcus epidermidis*; [Fig. S2](#)). Sebbene altre OTU strettamente correlate fossero presenti durante lo studio, questa stessa OTU era meno abbondante nei campioni non occupati e quando la camera era occupata da chiunque altro. L'unica femmina nel primo esperimento, il Soggetto 3, era fortemente associata a un *Lactobacillus* OTU ([Fig. S2](#)) simile al 100% a *Lactobacillus crispatus*, un batterio che si trova comunemente a dominare campioni vaginali sani. Questa OTU era essenzialmente assente per tutto il resto del primo esperimento. Tutti gli OTU discussi sopra erano anche taxa indicatori significativi ([Tabella 3](#)).

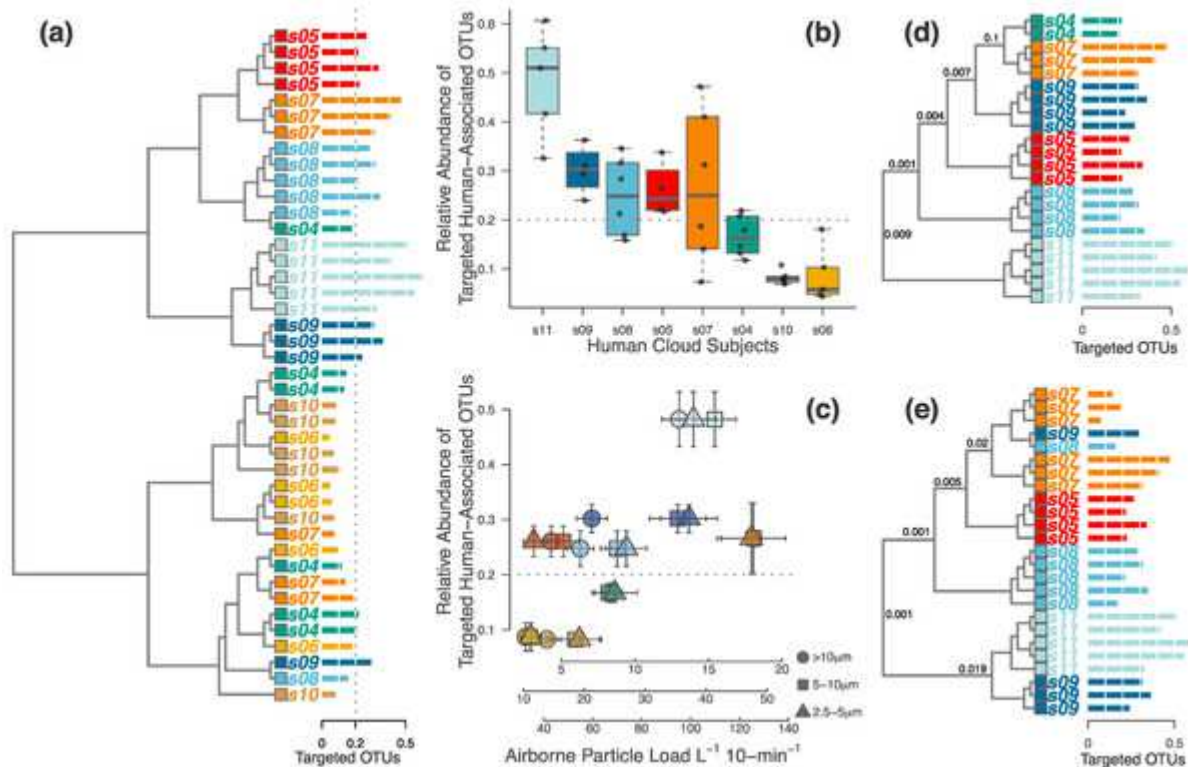


Figura 2: metà degli occupanti nel secondo esperimento erano chiaramente distinguibili, ma ciò dipendeva dall'entità dei batteri associati all'uomo eliminati durante l'occupazione.

(A) Quando si analizzano solo i taxa batterici associati all'uomo mirati, solo i campioni nella metà superiore del dendrogramma tendevano a essere classificati correttamente insieme. Quei campioni che non sono riusciti a raggrupparsi insieme erano generalmente al di sotto della soglia apparente del 20% associata all'uomo (linea tratteggiata grigia). Ogni punta sull'albero è un campione separato da un singolo occupante (*soggetto s04-s11*). Ogni occupante ha un colore diverso e i colori corrispondono alle [Figg. 3 e 4](#) . Le barre orizzontali (identiche a quelle utilizzate in D & E) mostrano la proporzione di OTU batteriche associate all'uomo mirate in ciascun campione. Questi stessi valori vengono visualizzati come y-assi in B e C. (B) Ogni occupante ha prodotto una proporzione consistente di taxa associati all'uomo. (C) Il conteggio delle particelle sospese nell'aria (asse x) è correlato alla proporzione di taxa associati all'uomo rilevati intorno a ciascun occupante (asse y). (D) Quando il set di dati era limitato ai soli campioni al di sopra della soglia del 20%, tutti i campioni vengono raggruppati in modo appropriato per singolo soggetto umano. (E) In alternativa, se si limita il set di dati solo a quegli *occupanti* la cui proporzione mediana del campione era superiore al 20%, i risultati erano quasi identici tranne che per due classificazioni errate. I valori di *P* mostrati ai nodi principali in D & E provengono dai test PERMANOVA sulla separazione dei singoli cladi.

[Scarica l'immagine a dimensione intera](#)

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / fig-2](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/fig-2)

Le nubi microbiche occupanti possono essere rilevate sulle superfici circostanti

Oltre alle particelle sospese nell'aria, abbiamo raccolto particelle sedimentate in piatti di sedimentazione sterili come stima del pool di particelle potenzialmente persistenti. Coerentemente con i risultati dei campioni di filtri dell'aria, i campioni occupati rispetto a quelli non occupati erano sempre significativamente diversi durante periodi di tempo di 4 ore ([Tabelle 1 e 2](#)) e le OTU più abbondanti in ciascuna prova riflettono quelle trovate nei filtri dell'aria ([Fig. S2](#)).

Sottoinsieme mirato di OTU associate all'uomo

Sulla base della predominanza di queste OTU associate all'uomo sull'aria di fondo nel primo esperimento e sulla precedente ricerca sul microbioma umano, abbiamo progettato il secondo esperimento e le successive analisi attorno a questo sottoinsieme di famiglie batteriche (*Corynebacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Aerococcaceae* e *Tissierellaceae*). Questi sono di seguito denominati "OTU mirati". Nello specifico, abbiamo selezionato queste famiglie in base a tre criteri: (1) Le OTU che rappresentano queste famiglie erano predittori consistentemente significativi di occupanti umani rispetto all'aria di fondo nel primo esperimento ([Tabella 3](#)); (2) le abbondanze relative di queste famiglie erano sempre elevate nei campioni occupati rispetto ai campioni non occupati; e (3) tutte queste famiglie sono costantemente rilevate come membri del microbioma umano sano ([HMP Consortium, 2012](#) ; [Grice & Segre, 2011](#) ; [Ravel et al., 2011](#)) e come indicatori dell'occupazione umana nell'ambiente costruito ([Fierer et al., 2010](#) ; [Flores et al., 2011](#) ; [Meadow et al., 2013](#) ; [Kembel et al., 2014](#) ; [Meadow et al., 2014](#)).

Identificabilità degli occupanti

I risultati del primo esperimento hanno illustrato che (a) gli occupanti emettono un segnale aereo rilevabile; (b) quel segnale è il risultato di un'elevata abbondanza di un insieme specifico di taxa batterici associati all'uomo; e (c) il segnale aereo personalizzato di ogni occupante può essere statisticamente differenziato dagli altri occupanti. Pertanto, il nostro secondo esperimento si è concentrato sull'analisi diretta del sottoinsieme di batteri presenti nell'aria associati all'uomo per determinare la rilevabilità e la natura personalizzata della nuvola microbica di un dato individuo. Per fare ciò, abbiamo campionato l'aria che circonda ciascuno degli 8 occupanti, così come l'aria di mandata e di scarico che entrano e escono rispettivamente dalla camera occupata ([Fig. S1B](#)). Abbiamo quindi analizzato il sottoinsieme mirato di OTU batteriche associate all'uomo, descritto sopra, per determinare se e quanti occupanti potessero essere differenziati statisticamente solo dall'aria circostante.

Abbiamo scoperto che ciascuno degli otto occupanti emetteva la propria concentrazione caratteristica di particelle sospese nell'aria. Queste concentrazioni di particelle erano correlate con la proporzione di batteri associati all'uomo nell'aria circostante e, successivamente, con la nostra capacità di identificare ogni singolo occupante dalla loro nuvola microbica ([Fig. 2A - 2C](#)). Come in precedenza, le nuvole microbiche di alcuni occupanti erano più rilevabili di altre e per ogni persona ciò era previsto dalla proporzione di OTU associate all'uomo mirate nel rispettivo set di dati di un occupante. Campioni in cui il sottoinsieme mirato di OTU composto da più del 20% del totale generalmente raggruppato correttamente dall'occupante, mentre quelli con meno non erano generalmente in grado di essere classificati come appartenenti a uno specifico occupante ([Fig. 2A, 2D e 2E](#)). La stessa soglia apparente del 20% si applica anche al segnale della nuvola umana rilevato nell'aria di scarico in uscita dalla camera. Siamo stati in grado di classificare l'aria di scarico come proveniente da un particolare

occupante solo se sono stati rilevati sufficienti taxa associati all'uomo, e questo è stato possibile solo per due degli otto occupanti. Per altri quattro, l'aria nella camera occupata era distinta dall'aria di fondo e generalmente dagli altri occupanti, ma non potevano essere rilevati nell'aria di scarico, mentre due occupanti non potevano essere rilevati affatto da sorgenti aeree. [La Figura 3](#) mostra tre di questi esempi di rilevabilità nell'aria occupata e nell'aria di scarico.

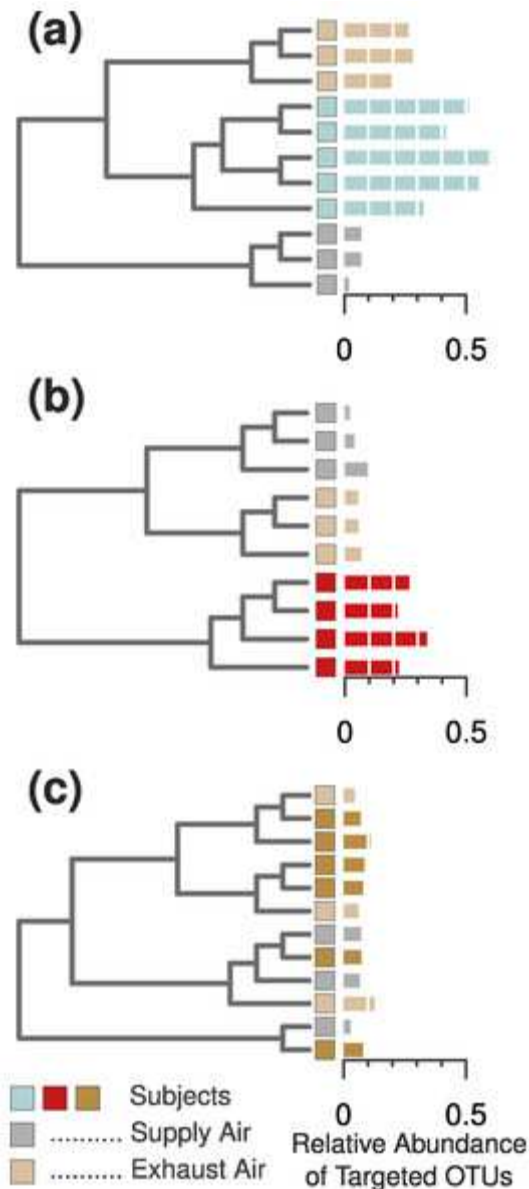


Figura 3: Tre casi esemplificativi di rilevabilità nella camera occupata e nel sistema di ventilazione di scarico.

(A) Il soggetto 11 è stato un esempio di rilevamento ideale nel sistema di ventilazione: siamo stati in grado di trovare concentrazioni di OTU associate all'uomo sufficienti per classificare correttamente l'aria che lascia la camera occupata. (B) La maggior parte degli occupanti, tuttavia, non ha emesso concentrazioni batteriche sufficienti per essere rilevata nel sistema di ventilazione, anche quando sono state prontamente rilevate all'interno della camera occupata. (C) Due soggetti hanno emesso concentrazioni quasi impercettibili di particelle ([Fig. 2C](#)) e OTU batteriche associate all'uomo ([Fig. 2B](#)), ed erano quindi impossibili da rilevare o identificare nella camera occupata o nel sistema di ventilazione di scarico.

[Scarica l'immagine a dimensione intera](#)

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / fig-3](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/fig-3)

Come nel primo esperimento, ogni occupante distinguibile era fortemente associato a singole OTU da gruppi tassonomici associati all'uomo. Ad esempio, entrambe le occupanti di sesso femminile mostrate in [Fig.4](#) (barre arancioni e rosse) erano associate a OTU correlate a batteri vaginali comuni (*Lactobacillus crispatus* e *Gardnerella vaginalis*), rispecchiando i risultati rilevanti per il genere del primo esperimento. Inoltre, mentre alcune OTU per *Corynebacterium* e *Propionibacterium* erano abbondanti e comuni tra tutti gli occupanti, alcune OTU individuali all'interno di questi generi erano indicative di singoli occupanti ([Fig.4](#)), indicando che la variazione a livello di specie o di ceppo nei batteri presenti nell'aria può informare i futuri studi sulla nuvola microbica e sull'identificabilità.

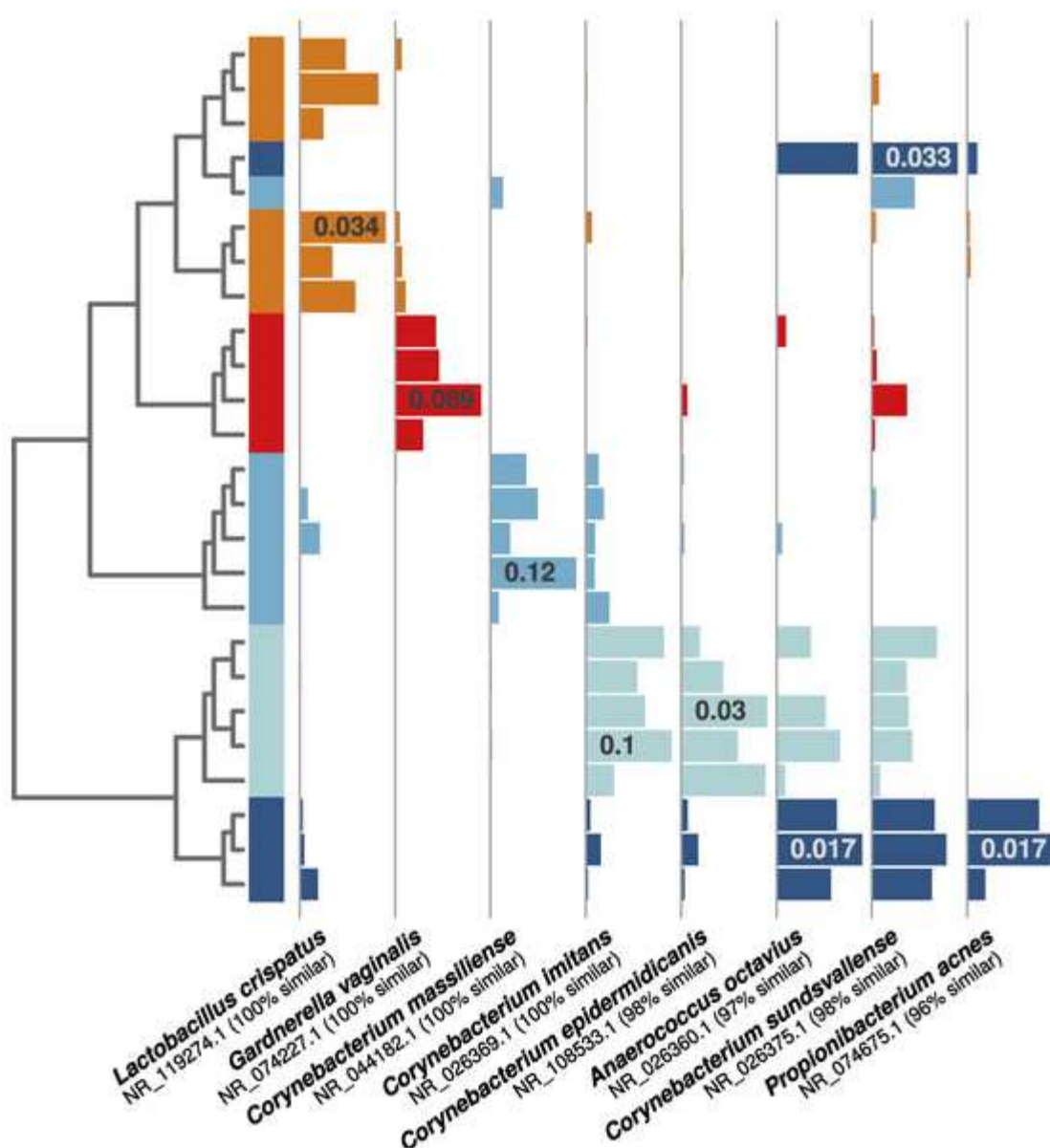


Figura 4: Le singole OTU batteriche associate all'uomo hanno aiutato a distinguere gli occupanti.

Quando si considerano i cinque occupanti più distinguibili statisticamente (diagramma a grappolo dalla [Fig. 2E](#)), ognuno è stato associato a una serie di OTU indicatori significativi e qui vengono

mostrati otto esempi. Ciascuno era (A) significativamente associato a un occupante (tutti i valori $p < 0,01$), (B) tra i 10 più abbondanti per quel dato occupante e (C) tra i 50 OTU mirati più abbondanti nell'intero set di dati. Le barre orizzontali mostrano l'abbondanza relativa di ciascuna OTU, con l'abbondanza relativa massima mostrata in una singola barra. I nomi OTU corrispondenti al database degli isolati NCBI 16S sono riportati sotto ogni serie di barre.

[Scarica l'immagine a dimensione intera](#)

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/fig-4)

Discussione

I nostri dati chiariscono che uno spazio occupato è microbicamente distinto da uno non occupato e rivelano per la prima volta che gli individui che occupano uno spazio possono emettere la propria distinta nuvola microbica personale. Non sorprende che gli esseri umani lascino la loro firma microbica nell'ambiente costruito ([Hospodsky et al., 2012](#) ; [Täubel et al., 2009](#) ; [Fierer et al., 2010](#) ; [Flores et al., 2011](#) ; [Flores et al., 2013](#) ; [Meadow et al., 2013](#) ; [Kembel et al., 2012](#)) o che gli esseri umani inattivi emettono particelle ([You et al., 2013](#)), ma il nostro studio suggerisce che le emissioni batteriche di una persona relativamente inattiva, ad esempio seduta a una scrivania, hanno una forte influenza sui batteri che circolano in uno spazio chiuso e sulle superfici circostanti. Precedenti ricerche hanno scoperto che l'attività umana in uno spazio interno risulta nella rilevazione di batteri presenti nell'aria associati all'uomo ([Hospodsky et al., 2012](#) ; [Meadow et al., 2013](#) ; [Qian et al., 2012](#)); questo segnale umano-microbico è dovuto a una combinazione di polvere risospesa, emissione dagli indumenti e emissione di particelle attive dagli occupanti. Nel nostro studio, abbiamo fatto tutti i tentativi per eliminare il potenziale di polvere risospesa pulendo a fondo l'interno di una camera climatica controllata ed eliminando la maggior parte dei movimenti all'interno della camera. Abbiamo controllato l'emissione di particelle legate all'abbigliamento facendo in modo che tutti gli occupanti indossassero indumenti identici, puliti, appena acquistati e minimali (canotta e pantaloncini). Il risultato è che ora abbiamo un quadro più chiaro dei tassi di perdita individuale, dell'identificabilità personale e del destino residuo della nube microbica personale nell'ambiente costruito.

Il nostro approccio consisteva nel misurare diversi aspetti della nube microbica personale: carico di particelle aerodisperse, comunità batteriche aerodisperse e comunità batteriche stanziate. Quando abbiamo appena provato a rilevare un occupante, tutti i periodi di campionamento di 4 ore durante il primo esperimento hanno portato a differenze di comunità aerotrasportate altamente significative tra le camere occupate e non occupate campionate simultaneamente ([Tabelle 1 e 2](#) ; [Fig.1](#)). Questa differenza era evidente indipendentemente dalla persona che occupava lo spazio, dall'utilizzo di aria o particelle sedimentate e dal fatto che gli occupanti fossero analizzati da soli o in combinazione con altri periodi di campionamento degli occupanti. Le OTU batteriche prominenti rilevate in ogni prova erano chiaramente indicative della loro fonte apparentemente umana ([Fig. S2](#)), e questo era evidente nelle OTU più abbondanti così come nei taxa indicatori (cioè, quelli più fortemente associati a ogni prova attraverso le repliche). Quando il campionamento tempo, e quindi l'airborne biomassa microbica, è stato tagliato a metà per prove 2 ore, i risultati erano generalmente costanti ([Tabella 2](#)), sebbene con maggiore variabilità tra gli occupanti, e questo suggerisce una potenziale

soglia di rilevamento data l'attuale tecnologia qui impiegata. Circa 1,2 m³ d'aria sono passati attraverso ciascun campionatore durante le prove di 2 ore e 2,4 m³ nelle prove di 4 ore; un m³ di aria può contenere fino a 10⁶ cellule batteriche, ma questa concentrazione può variare in base alla posizione, alla fonte di bioaerosol e alle condizioni ambientali ([Rook, 2013](#) ; [Burrows et al., 2009](#) ; [Tong & Lighthart, 2000](#) ; [Lighthart & Shaffer, 1995](#)). È possibile che una persona che occupa una stanza per un periodo di tempo più breve non rilasci un numero sufficiente di particelle batteriche per superare le concentrazioni batteriche di fondo nell'aria e quindi non venga rilevata. Sebbene siano necessarie ulteriori indagini per comprendere appieno i limiti del rilevamento del bioaerosol umano, i risultati del nostro secondo esperimento hanno supportato l'ipotesi che la rilevabilità sia una funzione della quantità di biomassa batterica rilasciata da un occupante. Il carico di particelle aerodisperse era generalmente predittivo del carico aereo di OTU batteriche associate all'uomo di ciascun occupante e, successivamente, della classificabilità di ogni persona.

I batteri presenti nell'aria sono solo un pool di microbi a breve termine emesso dagli occupanti in un dato spazio; quelli che si stabiliscono nel tempo hanno il potenziale per essere dispersi attraverso il contatto superficiale, o essere risospesi dal successivo movimento dell'occupante. Per comprendere meglio il destino della nuvola microbica personale, abbiamo anche raccolto particelle sedimentate in piatti di raccolta sterili attorno a ciascun occupante come proxy per il potenziale segnale residuo che un occupante potrebbe lasciarsi alle spalle. I batteri rilevati in questi piatti rispecchiavano quelli trovati nei filtri dell'aria ([Fig. S2](#) e [1](#) ; [Tabelle 1](#) e [2](#)), e gli stessi tratti distintivi di uno spazio occupato si riflettevano nelle OTU più abbondanti e nei taxa indicatori più significativi ([Fig. S2](#) e [Tabella 3](#)). Anche i risultati delle due diverse durate (periodi di campionamento di 2 e 4 ore nel primo esperimento) erano coerenti con i dati del filtro dell'aria; tutti e tre gli occupanti nel primo esperimento erano chiaramente distinguibili a 4 ore, mentre i segnali degli occupanti erano meno pronunciati dopo solo 2 ore ([Tabella 2](#)).

Uno dei più sorprendenti risultati dal primo esperimento era la misura in cui i tre diversi occupanti erano facilmente distinguibili l'uno dall'altro, sia dal punto di vista della comunità microbica e anche quando si considera individuale batterica OTU ([Figure 1](#), [E S2](#) ; [Tabelle 1](#) - [3](#)). Abbiamo progettato il secondo esperimento per capire meglio cosa porta alla rilevabilità e identificabilità aerea. Poiché le OTU più indicative provenivano da gruppi batterici associati all'uomo, abbiamo concentrato gli sforzi analitici solo su questo sottoinsieme di batteri presenti nell'aria. I singoli occupanti variavano nella loro proporzione di queste OTU mirate, dal 4 al 61% in un dato campione, ma ogni occupante era generalmente coerente nella concentrazione della propria nuvola microbica rilevabile ([Fig. 2C](#)).

Le particelle aerodisperse, indipendentemente dalla loro natura biologica, sono state misurate anche otticamente durante l'esperimento oltre alle comunità microbiche, per comprendere meglio le emissioni di particelle personalizzate da persone diverse ([Qian, Peccia & Ferro, 2014](#)). Le emissioni di particelle degli undici occupanti in questo studio variavano in modo sostanziale ma erano coerenti per ogni persona ([Tabella S1](#) e [Fig.](#)

[2C](#)). Potremmo aspettarci che l'occupante che emette la maggior parte delle particelle sia anche il più facilmente distinguibile dalla loro nuvola microbica. Questo era generalmente il caso, poiché le concentrazioni di particelle aerodisperse tendevano a correlarsi con la proporzione di taxa associati all'uomo e con l'identificazione personale. Tuttavia, abbiamo riscontrato chiare eccezioni a questa ipotesi. Ad esempio, il Soggetto 3 era sempre costantemente distinguibile dai dati microbici, eppure era quasi impercettibile tramite il conteggio delle particelle sospese nell'aria, mentre il Soggetto 2 ha rivelato lo schema opposto. Sebbene questo sollevi domande a cui non è possibile rispondere in modo definitivo, questa discrepanza potrebbe suggerire che il conteggio delle particelle da solo non può essere utilizzato come proxy per l'identificabilità della nuvola microbica personale, ma piuttosto riflettere la variazione interpersonale nell'igiene, nella salute della pelle, nella respirazione e nei tassi di sudorazione,

La potenziale identificabilità che riportiamo per le singole nuvole microbiche personali suggerisce chiaramente un'applicazione forense per bioaerosol indoor, ad esempio per rilevare la presenza passata di una persona in uno spazio interno. Tali applicazioni richiederanno sicuramente ulteriori ricerche; è probabile che i modelli che abbiamo trovato siano più sfumati in una folla di occupanti, in uno spazio interno più ampio o in presenza di polvere risospesa. La classificabilità personale nel nostro studio dipendeva probabilmente dalla biomassa microbica di fondo relativamente bassa (p. Es., Polvere) nella nostra camera sperimentale, e questi modelli non sono stati valutati in presenza di più occupanti, in modo simile al recente studio di identificabilità della superficie di Fierer e colleghi ([2010](#)). Tuttavia, a differenza dell'identificabilità dopo il contatto con la superficie, la nuvola microbica personale è altamente effimera, in modo tale che il rilevamento di un occupante dopo che ha lasciato uno spazio si baserà quasi inevitabilmente su particelle sedimentate o cattura nei sistemi di ventilazione. A questo punto, abbiamo scoperto che le particelle sedimentate rivelavano l'individualità degli occupanti e che almeno due persone erano rilevabili nell'aria di scarico che lasciava la camera occupata. In particolare, quando i tassi di cambio dell'aria sono stati aumentati da 1 a 3 ACH, la rilevabilità e l'identificabilità sono molto più difficili a causa della maggiore diluizione con l'aria di fondo ([Fig. S4](#)). Ciò suggerisce applicazioni importanti per comprendere l'impatto della ventilazione sulle trasmissioni microbiche da persona a persona nelle strutture sanitarie o durante le epidemie di malattie nell'ambiente costruito. La ventilazione è stata a lungo riconosciuta come importante per la trasmissione di malattie indoor e le nostre scoperte suggeriscono che l'aumento della velocità del flusso d'aria da 1 a 3 ACH elimina quasi la nube microbica umana rilevabile.

Le undici prove su occupanti diversi sono state condotte ciascuna in giorni diversi, richiedendo l'occupazione della camera da parte di una persona diversa ogni giorno. Le dinamiche temporali del bioaerosol a breve termine sono state rilevate in studi precedenti ([Meadow et al., 2013](#) ; [Bowers et al., 2013](#)), e abbiamo trovato differenze marginali tra i bioaerosol di fondo durante entrambi gli esperimenti qui riportati. Tuttavia, le differenze quotidiane tra i periodi di campionamento non occupati nel primo esperimento e tra i campioni di aria di alimentazione di giorni diversi nel secondo, erano molto inferiori in tutti i casi rispetto alle differenze tra i campioni occupati ([Fig. S3](#)). Né la variazione giornaliera è stata accompagnata da taxa indicatori

significativi che differenziano i campioni non occupati da un giorno all'altro, mentre la maggior parte degli occupanti è stata personalizzata nei taxa indicatori emessi. Inoltre, le OTU più abbondanti rilevate nei campioni occupati cambiavano insieme agli occupanti, mentre le stesse OTU erano più abbondanti ogni giorno nei campioni non occupati, indipendentemente da quando erano state prese. Pertanto, le dinamiche temporali quotidiane erano meno sostanziali della netta differenza che abbiamo osservato tra gli occupanti.

In quanto esseri umani, trascorriamo una parte sostanziale della nostra vita in ambienti [chiusi](#), fino al 90% nei paesi industrializzati ([Klepeis et al., 2001](#)) e si prevede che la densità umana nelle aree urbane aumenterà. Mentre siamo al chiuso, interagiamo costantemente con i microbi che altre persone hanno lasciato sulle sedie su cui sediamo, nella polvere che perturbiamo e su ogni superficie che tocchiamo. Queste interazioni umano-microbiche si aggiungono ai microbi che i nostri animali domestici lasciano nelle nostre case, quelli che si staccano dalle foglie degli alberi e dal suolo, quelli nel cibo che mangiamo e l'acqua che beviamo. Sta diventando sempre più chiaro che ci siamo evoluti con queste complesse interazioni microbiche e che possiamo dipendere da esse per il nostro benessere ([Rook, 2013](#)). È ora evidente, dati i risultati presentati qui, che i microbi che incontriamo includono quelli emessi attivamente da altri esseri umani, comprese le nostre famiglie, colleghi e perfetti sconosciuti.

Informazioni supplementari

Figura S1

Schema della camera sperimentale durante entrambi gli esperimenti. (a) L'obiettivo del primo esperimento era di distinguere le comunità batteriche nell'aria occupate da quelle non occupate. Così la camera di prova è stata divisa in due porzioni identiche e l'aria è stata raccolta simultaneamente su entrambi i lati. La velocità dell'aria di alimentazione (che entra attraverso il plenum del soffitto) è stata determinata per sostituire il volume d'aria rimosso dal campionamento sotto vuoto, nonché per creare una leggera pressione positiva all'interno della camera occupata. (b) Il secondo esperimento è stato progettato per distinguere tra gli occupanti, quindi la camera di prova non è stata divisa, ma sono stati prelevati campioni di vuoto nel sistema di ventilazione di alimentazione, che circonda l'occupante nella camera e anche nel sistema di ventilazione di scarico. Durante il secondo esperimento, la velocità dell'aria di alimentazione ha prodotto 1 e 3 ACH.

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / supp-1](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/supp-1)

[Scarica](#)

Tabella S1

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / supp-2](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/supp-2)

[Scarica](#)

Figura S2

Gli indicatori OTU del primo esperimento erano coerenti per gli occupanti indipendentemente dal metodo di campionamento. (a) Le OTU più abbondanti nei filtri dell'aria di 4 ore erano chiaramente indicative di aria occupata (le prime sette OTU) o di aria non occupata (le ultime tre OTU), indipendentemente dall'occupante. L'OTU superiore (*Staphylococcus epidermidis*) era l'OTU più abbondante trovato nei campioni occupati. (b) Queste stesse OTU erano anche costantemente abbondanti nei piatti di sedimentazione. Le barre indicano l'abbondanza relativa media e le barre di errore mostrano ± 1 errore standard; il numero di repliche in ogni trattamento è dettagliato nella [Tabella 2](#). Otto di queste dieci OTU erano anche taxa indicatori significativi inclusi nella [tabella 3](#).

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / supp-3](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/supp-3)

[Scarica](#)

Figura S3

Le differenze significative tra le nuvole microbiche personali degli occupanti non sono spiegate dai cambiamenti temporali negli assemblaggi microbici presenti nell'aria di fondo. Abbiamo rilevato differenze marginali nei batteri di fondo (cioè, cambiamenti temporali quotidiani). Queste differenze, tuttavia, erano trascurabili rispetto alle differenze tra i diversi occupanti. (A sinistra) Le somiglianze comunitarie nel grafico a sinistra (campioni occupati dal primo esperimento; stessi dati mostrati in [Fig. 1E](#)) mostrano che gli occupanti erano più simili ad altri campioni della stessa persona che ad altri occupanti, indipendentemente dal metodo di campionamento. Questa differenza era significativamente più pronunciata di quella dei campioni non occupati (a destra) presi simultaneamente durante i periodi di campionamento. Le barre di errore rappresentano ± 1 errore standard sulle somiglianze di Canberra a coppie.

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / supp-4](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/supp-4)

[Scarica](#)

Figura S4

Con 1 cambio d'aria all'ora (a sinistra), gli occupanti erano, in media, rilevabili all'interno della camera, ma meno nell'aria di scarico. Quando i tassi di cambio dell'aria sono stati triplicati (a destra), questi segnali sono scomparsi e non un singolo occupante è stato rilevabile in modo coerente, anche nell'aria interna occupata. Le barre mostrano i valori di similarità Jaccard medi ± 1 errore standard.

DOI: [10.7717 / peerj.1258 / supp-5](https://doi.org/10.7717/peerj.1258/supp-5)

[Scarica](#)

Informazioni e dichiarazioni aggiuntive

Interessi conflittuali

Jessica Green è un redattore accademico per PeerJ.

Contributi dell'autore

[James F. Meadow](#) ha concepito e progettato gli esperimenti, eseguito gli esperimenti, analizzato i dati, scritto il documento, preparato figure e / o tabelle, revisionato le bozze del documento.

[Adam E. Altrichter](#) e [Ashley C. Bateman](#) hanno ideato e progettato gli esperimenti, eseguito gli esperimenti, rivisto le bozze del documento.

[Jason Stenson](#) ha ideato e progettato gli esperimenti, eseguito gli esperimenti, analizzato i dati, preparato figure e / o tabelle, revisionato le bozze del documento.

[GZ Brown](#) ha ideato e progettato gli esperimenti, ha fornito reagenti / materiali / strumenti di analisi, ha rivisto le bozze del documento.

[Jessica L. Green](#) e [Brendan JM Bohannon](#) hanno concepito e progettato gli esperimenti, eseguito gli esperimenti, fornito reagenti / materiali / strumenti di analisi, revisionato le bozze del documento.

Etica umana

Sono state fornite le seguenti informazioni relative alle approvazioni etiche (ovvero, l'ente di approvazione e qualsiasi numero di riferimento):

I soggetti sono stati informati della piena natura e del design dello studio e hanno dato il consenso scritto a partecipare. Tutti i protocolli di ricerca sono stati approvati dal Consiglio di revisione istituzionale dell'Università dell'Oregon (protocollo n. 03172014.021). Le identità dei partecipanti non sono mai state registrate su campioni o nei set di dati risultanti.

Deposizione del DNA

Sono state fornite le seguenti informazioni in merito alla deposizione di sequenze di DNA:

Tutti i dati di sequenza utilizzati in questo documento sono stati depositati nel repository di dati ad accesso aperto Figshare:

[10.6084 / m9.figshare.1506779](https://figshare.com/10.6084/m9.figshare.1506779) .

Tutti gli script utilizzati nell'analisi statistica possono essere trovati in GitHub:

https://github.com/jfmeadow/Meadow_HumanMicrobialCloud_Analysis .

Finanziamento

Questo lavoro è stato finanziato da una sovvenzione al Biology and the Built Environment Center della Alfred P. Sloan Foundation Microbiology for the Built

Environment Programme. I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio, nella raccolta e analisi dei dati, nella decisione di pubblicare o nella preparazione del manoscritto.

Ringraziamenti

Ringraziamo i membri del Biology and the Built Environment Center per il loro contributo nella progettazione sperimentale e del laboratorio Energy Studies in Buildings per l'assistenza presso la loro struttura di camere climatiche. Ringraziamo anche la dottoressa Seema Bhangar per i suoi consigli sulla raccolta e l'analisi dei dati sulle particelle. Infine, ringraziamo 11 occupanti umani volontari anonimi per aver versato i loro bioaerosol nei nostri apparati di campionamento.

Riferimenti

- **Adams R , Miletto M , Taylor J , Bruns T . 2013.** [Dispersione nei microbi: i funghi nell'aria interna sono dominati dall'aria esterna e mostrano limiti di dispersione a brevi distanze.](#) *ISME Journal* **7** :1262-1273
- **Adams RI , Bhangar S , Pasut W , Arens EA , Taylor JW , Lindow SE , Nazaroff WW , Bruns TD . 2015.** [Studio del bioaerosol da camera: aria esterna e occupanti umani come fonti di microbi aerodispersi interni.](#) *PLoS ONE* **10** (5):e0128022
- **Bhangar S , Adams RI , Pasut W , Huffman JA , Arens EA , Taylor JW , Bruns TD , Nazaroff WW . 2015.** [Studio del bioaerosol della camera: emissioni umane di particelle di aerosol biologici fluorescenti risolte per dimensione.](#) *Indoor Air* Epub prima della stampa il 14 marzo 2015
- **Bowers R , McCubbin io , Hallar A , Fierer N . 2012.** [Variabilità stagionale nelle comunità batteriche aerodisperse in un sito ad alta quota.](#) *Ambiente atmosferico* **50** :41-49
- **Bowers R , McLetchie S , cavaliere R , Fierer N . 2011.** [Variabilità spaziale nelle comunità batteriche aerodisperse tra i tipi di utilizzo del suolo e la loro relazione con le comunità batteriche dei potenziali ambienti di origine.](#) *ISME Journal* **5** :601-612
- **Bowers RM , Clements N , Emerson JB , Wiedinmyer C , Hannigan MP , Fierer N . 2013.** [Variabilità stagionale nella diversità batterica e fungina dell'atmosfera superficiale.](#) *Scienze e tecnologie ambientali* **47** :12097-12106
- **Cunicoli S , Elbert W , Lawrence M , Pöschl U . 2009.** [Batteri nell'atmosfera globale - parte 1: revisione e sintesi dei dati della letteratura per diversi ecosistemi.](#) *Discussioni su chimica e fisica dell'atmosfera* **9** :9263-9280
- **Caporaso J , Kuczynski J , Stombaugh J , Bittinger K , Bushman F , Costello E , Fierer N , Gonzalez Pena A , Goodrich J , Gordon J +17 altri . 2010.** [QIIME consente l'analisi dei dati di sequenziamento della comunità ad alto rendimento.](#) *Nature Methods* **7** :335-336

- Caporaso JG , Lauber CL , Walters WA , Berg-Lyons D , Huntley J , Fierer N , Owens SM , Betley J , Fraser L , Bauer M +4 altri . 2012. [Analisi della comunità microbica ad altissima velocità di trasmissione sulle piattaforme illumina hiseq e miseq](#). *ISME Journal* **6** :1621-1624
- Carnelley T , Haldane J , Anderson A . 1887. [L'acido carbonico, la materia organica e i microrganismi presenti nell'aria, soprattutto nelle abitazioni e nelle scuole](#). *Transazioni filosofiche della Royal Society of London. Serie B: Scienze biologiche* **178** :61-111
- DeSantis T , Hugenholtz P , Larsen N , Rojas M , Brodie E , Keller K , Huber T , Dalevi D , Hu P , Andersen G . 2006. [Greengenes, un database del gene rRNA 16S controllato da chimera e un workbench compatibile con arb](#). *Applied and Environmental Microbiology* **72** :5069-5072
- Dufrière M , Legendre P . 1997. [Assemblaggi di specie e specie indicatrici: la necessità di un approccio asimmetrico flessibile](#). *Monografie ecologiche* **67** :345-366
- Edgar R . 2010. [Cerca e raggruppa ordini di grandezza più velocemente di BLAST](#). *Bioinformatica* **26** :2460-2461
- Edgar R . 2013. [Uparse: sequenze OTU altamente accurate da letture di ampliconi microbici](#). *Nature Methods* **10** :996-998
- Fadrosch D , Ma B , Gajer P , Sengamalay N , Ott S , Brotman R , Ravel J . 2014. [Un approccio migliorato a doppia indicizzazione per il sequenziamento del gene rRNA 16S multiplex sulla piattaforma MiSeq Illumina](#). *Microbioma* **2** :e6
- Fierer N , Lauber CL , Zhou N , McDonald D , Costello EK , Cavaliere R . 2010. [Identificazione forense utilizzando comunità batteriche della pelle](#). *Atti della National Academy of Sciences degli Stati Uniti d'America* **107** :6477-6481
- Flores GE , Bates ST , Caporaso JG , Lauber CL , Leff JW , Cavaliere R , Fierer N . 2013. [Diversità, distribuzione e fonti di batteri nelle cucine residenziali](#). *Microbiologia ambientale* **15** :588-596
- Flores GE , Bates ST , Cavaliere R , Lauber CL , Stombaugh J , Cavaliere R , Fierer N . 2011. [Biogeografia microbica delle superfici dei bagni pubblici](#). *PLoS ONE* **6** :e28132
- Franzosa E , Huang K , Prato J , Gevers D , Lemond K , Bohannan B , Huttenhower C . 2015. [Identificazione dei microbiomi personali utilizzando codici metagenomici](#). *Atti della National Academy of Sciences degli Stati Uniti d'America* **22** :E2930-E2938
- Fujimura KE , Demoor T , Rauch M , Faruqi AA , Jang S , Johnson CC , Boushey HA , Zoratti E , Ownby D , Lukacs NW 1 altra . 2013. [L'esposizione alla polveredomesticamedia l'arricchimento del microbioma intestinale Lactobacillus e la difesa immunitaria delle vie aeree contro allergeni e infezioni virali](#). *Atti della National Academy of Sciences degli Stati Uniti d'America* **111** :805- 810
- Fujimura KE , Johnson CC , Ownby DR , Cox MJ , Brodie EL , Havstad SL , Zoratti EM , Woodcroft KJ , Bobbitt KR , Wegienka G +2 altri . 2010. [Il migliore amico dell'uomo? L'effetto del possesso di animali domestici sulle comunità microbiche della polvere domestica](#). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **126** :410-412
- Grice E , Segre J . 2011. [Il microbioma cutaneo](#). *Nature Reviews Microbiology* **9** :244-253

- **Consorzio HMP . 2012.** [Struttura, funzione e diversità del microbioma umano sano.](#) *Nature* **486** :207-214
- **Hospodsky D , Qian J , Nazaroff WW , Yamamoto N , Bibby K , Rismani-Yazdi H , Peccia J . 2012.** [Occupazione umana come fonte di batteri presenti nell'aria indoor.](#) *PLoS ONE* **7** :e34867
- **Hospodsky D , Yamamoto N , Nazaroff W , Miller D , Gorthala S , Peccia J . 2014.** [Caratterizzazione delle concentrazioni di funghi e batteri nell'aria e dei tassi di emissione in sei classi occupate dai bambini.](#) *Indoor Air* Epub prima della stampa 18 aprile 2012
- **Kembel SW , Jones E , Kline J , Northcutt D , Stenson J , Womack AM , Bohannon BJ , Brown GZ , Green JL . 2012.** [Il design architettonico influenza la diversità e la struttura del microbioma dell'ambiente costruito.](#) *ISME Journal* **6** :1469-1479
- **Kembel SW , Meadow JF , O'Connor TK , Mhuireach G , Northcutt D , Kline J , Moriyama M , Brown GZ , Bohannon BJM , Green JL . 2014.** [Il design architettonico guida la biogeografia delle comunità batteriche indoor.](#) *PLoS ONE* **9** :e87093
- **Klepeis NE , Nelson WC , Ott WR , Robinson JP , Tsang AM , Switzer P , Behar JV , Hern S C , Engelmann WH . 2001.** [L'indagine nazionale sui modelli di attività umana, \(nhap\): una risorsa per valutare l'esposizione agli inquinanti ambientali.](#) *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **11** :231-252
- **Kwan K , Cooper M , La Duc M , Vaishampayan P , Stam C , Benardini J , Scalzi G , Moissl-Eichinger C , Venkateswaran K . 2011.** [Valutazione di procedure per la raccolta, l'elaborazione e l'analisi di biomolecole da superfici a bassa biomassa.](#) *Microbiologia applicata e ambientale* **77** :2943-2953
- **Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, Owens SM, Handley KM, Scott NM, Gibbons SM, Larsen P, Shogan BD, Weiss S+ 10 more. 2014.** [Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment.](#) *Science* **345**:1048-1052
- **Lighthart B , Shaffer B . 1995.** [Batteri aerodispersi nello strato superficiale atmosferico: distribuzione temporale sopra un campo di semi di erba.](#) *Applied and Environmental Microbiology* **61** (4):1492-1496
- **Meadow J , Altrichter A , Kembel S , Moriyama M , O'Connor T , Womack A , Brown G , Green J , Bohannon BJ . 2014.** [Le comunità batteriche sulle superfici delle classi variano con il contatto umano.](#) *BMC Microbiome* **2** :e7
- **Meadow JF , Altrichter AE , Kembel SW , Kline J , Mhuireach G , Moriyama M , Northcutt D , O'Connor TK , Womack AM , Brown GZ +2 altri . 2013.** [Le comunità batteriche aerodisperse all'interno sono influenzate dalla ventilazione, dall'occupazione e dalla fonte di aria esterna.](#) *Indoor Air* **24** :41-48
- **Nazaroff W . 2014.** [Dinamica del bioaerosol indoor.](#) *Indoor Air* Epub prima della stampa il 27 dicembre 2014
- **Noble W , Habbema J , Van Furth R , Smith I , De Raay C . 1976.** [Studi quantitativi sulla dispersione dei batteri della pelle nell'aria.](#) *Journal of Medical Microbiology* **9** :53-61

- Oksanen J , Blanchet FG , Kindt R , Legendre P , Minchin PR , O'Hara RB , Simpson GL , So lymos P , Stevens MHH , Wagner H . 2011. [Vegan: pacchetto ecologico comunitario](#) .
- Paradis E , Claude J , Strimmer K . 2004. [Ape: analisi di filogenetica ed evoluzione in lingua r](#). *Bioinformatica* **20** :289-290
- Qian J , Hospodsky D , Yamamoto N , Nazaroff W , Peccia J . 2012. [Tassi di emissione risolti per dimensione di batteri e funghi trasportati dall'aria in una classe occupata](#). *Aria interna* **22** :339-351
- Qian J , Peccia J , Ferro A . 2014. [Risospensione di particelle indotte dal cammino in ambienti interni](#). *Ambiente atmosferico* **89** :464-481
- R Development Core Team . 2010. [R: un linguaggio e un ambiente per il calcolo statistico](#) . Vienna: The R Foundation for Statistical Computing . Disponibile a <http://www.R-project.org/>
- Ravel J , Gajer P , Abdo Z , Schneider GM , Koenig SSK , McCulle SL , Karlebach S , Gorle R , Russell J , Tacket CO [+5 altri](#) . 2011. [Microbioma vaginale delle donne in età riproduttiva](#). *Atti della National Academy of Sciences degli Stati Uniti d'America* **108** :4680-4687
- Roberts D . 2010. [labdsv: ordinazione e analisi multivariata per l'ecologia](#) .
- Rook G . 2013. [Regolazione del sistema immunitario da parte della biodiversità dall'ambiente naturale: un servizio ecosistemico essenziale per la salute](#). *Atti della National Academy of Sciences degli Stati Uniti d'America* **110** :18360-18367
- Sherertz R , Bassetti S , Bassetti-Wyss B . 2001. [Operatori sanitari nel cloud](#). *Malattie infettive emergenti* **7** :241-244
- Tang J , Noakes C , Nielsen P , Eames io , Nicolle A , Li Y , deposita G . 2011. [Osservazione e quantificazione dei flussi d'aria nel controllo delle infezioni di malattie trasmesse da aerosol e per via aerea: una panoramica degli approcci](#). *Journal of Hospital Infection* **77** :213-222
- Täubel M , Rintala H , Pitkäranta M , Paulin L , Laitinen S , Pekkanen J , Hyvärinen A , Nevalainen A . 2009. [L'occupante come fonte di batteri della polvere domestica](#). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **124** :834-840
- Tong Y , Lighthart B . 2000. [La concentrazione annuale di particelle batteriche e la distribuzione dimensionale nell'atmosfera ambiente in un'area rurale della valle di willamette, oregon](#). *Aerosol Science and Technology* **32** :393-403
- Tracy LT , Lai AC , Moreno-Jackson R , Sextro RG , Nazaroff WW . 2002. [Effetti dell'arredamento della stanza e della velocità dell'aria sui tassi di deposizione di particelle all'interno](#). *Atmospheric Environment* **36** :1811-1819
- Tyndall J . 1876. [Osservazioni sul comportamento ottico dell'atmosfera in riferimento ai fenomeni di putrefazione e infezione](#). *British Medical Journal* **1** :121-124
- Tyndall J . 1881. [Saggi sulla materia fluttuante dell'aria: in relazione a putrefazione e contagio](#) . London: Longans, Verde, e co .
- È R , Cui W , Chen C , Zhao B . 2013. [Misurare i tassi di emissione a breve termine di particelle nella "nuvola personale" con diversi vestiti e intensità di attività in una camera sigillata](#). *Ricerca su aerosol e qualità dell'aria* **13** :911-921

