GABRIEL GUARANY DE ARAUJO

**RESPOSTA BIOLÓGICA DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE*
AO AMBIENTE ATMOSFÉRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2017

GABRIEL GUARANY DE ARAUJO

**RESPOSTA BIOLÓGICA DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE*
AO AMBIENTE ATMOSFÉRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Douglas Galante

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Teixeira Gonçalves

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Guarany de Araujo, Gabriel

Resposta biológica de *Pseudomonas syringae* ao ambiente atmosférico / Gabriel Guarany de Araujo; orientador Douglas Galante; coorientador Fábio Luiz Teixeira Gonçalves. -- São Paulo, 2017.

102 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Pseudomonas*. 2. Microbiologia ambiental. 3. Nucleação de gelo. 4. Atmosfera. 5. Radiação ultravioleta. I. Galante, Douglas, orientador. II. Luiz Teixeira Gonçalves, Fábio, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Gabriel Guarany de Araujo

Título da Dissertação: Resposta biológica de *Pseudomonas syringae* ao ambiente atmosférico.

Orientador(a): Dr. Douglas Galante

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 687/14 referente ao projeto intitulado: “*Resposta biológica de Pseudomonas syringae ao ambiente atmosférico*” sob a responsabilidade de **Gabriel Guarany de Araújo**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Douglas Galante (LNLS – CNPEM) e meu coorientador Prof. Dr. Fábio Luiz Teixeira Gonçalves (IAG – USP).

Ao Prof. Dr. Fabio Rodrigues (IQ – USP) por ceder o espaço de seu laboratório para os experimentos.

À minha orientadora pro tempore Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg pelo auxílio durante o ingresso na pós-graduação.

Aos membros da minha banca de qualificação, Profa. Dra. Vivian Helena Pelizzari, Prof. Dr. Welington Luiz de Araujo, e Profa. Dra. Cristina Rossi Nakayama, pelos comentários construtivos.

Ao grupo Zenith da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC – USP), pelo desenvolvimento da sonda estratosférica utilizada nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader (IQ - USP) pelo empréstimo do banho de baixa temperatura.

A Evandro Pereira da Silva e André Arashiro Pulschen pelo auxílio nos experimentos.

AGRADECIMENTOS

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto 2012/18936-0), ao Projeto Microsfera (Processo 407816/2013-5) do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR – CNPq), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Criosfera (INCT – Criosfera), ao Núcleo de Pesquisa em Astrobiologia da Universidade de São Paulo (NAP – Astrobio/USP), e ao Instituto Nacional de Estudos do Espaço (INEspaço – CNPq), pelo financiamento das pesquisas.

RESUMO

ARAUJO, G. G. **Resposta biológica de *Pseudomonas syringae* ao ambiente atmosférico.** 2017. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A bactéria epifítica *Pseudomonas syringae* produz a partir de proteínas na sua membrana externa os núcleos de gelo biológicos mais ativos e estudados. Bioaerossóis destas células tem potencial de participar no congelamento da água na atmosfera, podendo influenciar o processo de precipitação. Corroborando esta ideia, este organismo já foi detectado em amostras de chuva, neve, e diretamente de nuvens. Neste trabalho, foi estudado como as condições as quais *P. syringae* está sujeita durante sua suspensão no ar (o ultravioleta e a dessecação em particular) afetam sua sobrevivência e sua atividade de nucleação de gelo. Duas cepas foram testadas, pertencentes aos patovares *syringae* e *garcae*, capazes de produzir entre 10^{-2} e 10^{-1} núcleos de gelo por célula ativos a -5°C . Ambas apresentaram baixa tolerância às faixas do UV-C (254 nm) e UV-B (312 nm) de lâmpadas com emissão monocromática nestes comprimentos de onda, semelhantes à *E. coli*. Contudo, exibiram maior resistência quando expostas a um espectro contínuo mais fiel ao ultravioleta encontrado no ambiente, contendo UV-A e UV-B. Menos de 90% das suas células foram inativadas por este tratamento, o que pode equivaler a horas de exposição direta ao Sol no ambiente real. Para o pv. *syringae*, nenhum dos testes com ultravioleta (mesmo com fluências capazes de inativá-las por completo) afetou sua atividade de congelamento a -5°C , enquanto que para o pv. *garcae* uma redução de 10 a 100 x foi observada em alguns casos. Em experimentos de dessecação por 6 dias a 20°C , em diferentes umidades relativas, a resposta das cepas foi contrastante. Notavelmente, o pv. *garcae* se mostrou muito mais resistente, mantendo aproximadamente 20% de sua viabilidade sob uma umidade relativa abaixo de 5%, enquanto o pv. *syringae* foi inativado em mais de 99,9%. Em contrapartida, o pv. *syringae* sofreu apenas uma queda moderada em sua atividade de nucleação sob este tratamento, enquanto o pv. *garcae* teve seu congelamento reduzido substancialmente – em um processo que pode estar mais relacionado à temperatura em que as células foram armazenadas do que à desidratação em si. Em ensaios adicionais, estas bactérias foram expostas ao ambiente real da estratosfera em um voo de balão de grande altitude, e, em laboratório, a uma simulação multiparamétrica das condições no topo da troposfera. Para as amostras que, nestes dois experimentos, foram protegidas do ultravioleta, o padrão de sobrevivência das duas cepas foi semelhante aos testes de dessecação. Em suma, fatores de estresse presentes na atmosfera afetam cepas de *P. syringae*, e sua nucleação de gelo, com diferentes graus de severidade. Notou-se, entretanto, sempre alguma atividade de congelamento residual a -5°C , uma temperatura relativamente alta, ainda possivelmente capaz de ter um impacto ambiental.

Palavras-chave: *Pseudomonas*. Microbiologia ambiental. Nucleação de gelo. Atmosfera. Radiação ultravioleta.

ABSTRACT

ARAÚJO, G. G. **Biological response of *Pseudomonas syringae* to the atmospheric environment.** 2017. 102 p. Master's thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The epiphytic bacterium *Pseudomonas syringae* produces, from outer membrane proteins, the most active and studied biological ice nuclei. Bioaerosols of these cells have the potential to take part in the freezing of water in the atmosphere, which may influence the process of precipitation. Supporting this idea, this organism has been detected in rain and snow samples, and even directly in cloud water. In this work, it was studied how the conditions to which *P. syringae* is subjected during its suspension in the air (ultraviolet and desiccation in particular) affect its survival and its ice nucleation activity. Two strains were tested, belonging to the *syringae* and *garcae* pathovars, capable of producing 10^{-2} to 10^{-1} ice nuclei per cell active at -5°C . Both strains presented a low tolerance to the UV-C (254 nm) and UV-B (312 nm) bands of lamps with a monochromatic emission in these wavelengths, similarly to *E. coli*. However, they exhibited a greater resistance when exposed to a continuous spectrum more faithful to the ultraviolet found on the environment, containing UV-A and UV-B. Less than 90% of their cells were inactivated by this treatment, what may be equivalent to hours of direct exposure to the Sun in a real environment. For pv. *syringae*, none of the tests with ultraviolet (even with fluences capable of completely inactivating them) affected its freezing activity at -5°C , while for pv. *garcae* a reduction of 10 to 100 x was observed in some cases. In desiccation experiments for 6 days at 20°C , at different relative humidities, the response of the strains was contrasting. Notably, pv. *garcae* was much more resistant, maintaining about 20% of its viability under a relative humidity below 5%, while as inactivated by more than 99.9%. On the other hand, pv. *syringae* suffered just a moderate decrease in its nucleation activity under this treatment, while pv. *garcae* had its freezing substantially reduced – in a process that may be more related to the temperature that the cells were stored in than the dehydration itself. In additional assays, these bacteria were exposed to the real stratospheric environment in a high-altitude balloon flight, and to a laboratory multiparametric simulation of the conditions at the top of the troposphere. For the samples that, in both experiments, were protected from the ultraviolet, the survival pattern was similar to the desiccation tests. In sum, stress factors present in the atmosphere affect *P. syringae* strains, and their ice nucleation, with different degrees of severity. It was noticed, though, always some residual freezing activity at -5°C , still possibly capable of having an environmental impact.

Keywords: *Pseudomonas*. Environmental microbiology. Ice nucleation. Atmosphere. Ultraviolet radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da barreira de energia livre de Gibbs (ΔG) para o congelamento homogêneo e heterogêneo da água, com indicação do tamanho crítico do embrião de gelo necessário para a nucleação.	18
Figura 2 - Modelo de estrutura proposto para uma porção (cerca de 1/8) da região central de proteínas de nucleação de gelo bacterianas.	21
Figura 3 - Ilustração do processo de formação e destruição dos núcleos de gelo mais eficientes na superfície das células a partir das proteínas de nucleação de gelo (apresentadas esquematicamente como hexágonos).	22
Figura 4 - Árvore das relações filogenéticas entre as sequências de proteínas de nucleação de gelo com função experimentalmente verificada (em vermelho) e apenas putativa (em preto), disponíveis na base de dados UniProt.	24
Figura 5 - Esquema da atividade dos núcleos de condensação e dos núcleos de gelo em nuvens.	27
Figura 6 - Frações super-resfriadas médias de nuvens (<i>supercooled cloud fractions</i> , SCF) sobre diferentes porções do globo.	28
Figura 7 - Esquema do processo de Wegener-Bergeron-Findeisen para a formação da precipitação.	29
Figura 8 - Estrutura vertical da atmosfera terrestre, com a temperatura apresentada pela linha cheia e a pressão pelo pontilhado.	31
Figura 9 - Exemplos de espectros de atividade de nucleação de gelo de algumas bactérias.	36
Figura 10 - Comparação dos espectros (em unidades arbitrárias de fluxo): do Sol sobre a superfície da Terra (ASTM G173-03), do Simulador Solar Sol-UV-2, e das lâmpadas de UV-B e UV-C utilizadas neste trabalho, medidos com um espectrômetro Ocean Optics QE65000.	41
Figura 11 - Espectro do simulador solar com filtro AM1 utilizado nos experimentos com a Câmara de Simulação de Ambientes Espaciais e Planetários.	48
Figura 12 - Espectro da atividade de nucleação de gelo das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> . As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	50
Figura 13 - Curva de sobrevivência ao UV-C (254 nm) das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> e de <i>E. coli</i> BL21. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	52
Figura 14 - Curva de sobrevivência ao UV-B (312 nm) das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> e de <i>E. coli</i> BL21. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	53
Figura 15 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> expostas ao UV-C. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	56
Figura 16 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> expostas ao UV-B. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	57
Figura 17 - Curva de sobrevivência ao UV ambiental (UV-A + UV-B) das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> , e de <i>E. coli</i> BL21 crescida em meio LB e em meio L _{NP} . As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	59
Figura 18 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> expostas ao UV ambiental (UV-A + UV-B). As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	61
Figura 19 - Sobrevivência (N/N_0) dos controles mantidos hidratados em solução e das amostras dessecadas sob RH 33% e <5%. Foram testadas as cepas 281 e 158 de <i>P.</i>	

<i>syringae</i> , e <i>E. coli</i> BL21 crescida tanto em meio LB e em meio L _{NP} . As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	62
Figura 20 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> mantidas hidratadas, ou expostas a RH 33% ou <5%. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	65
Figura 21 - Sobrevivência (N/N ₀) dos controles mantidos hidratados em solução e das amostras dessecadas sob RH 33% e <5%. A cepa 158 de <i>P. syringae</i> , foi testada mantida a 20 °C (mesmos dados que a Figura 19) ou a 4 °C. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	66
Figura 22 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras da cepa 158 de <i>P. syringae</i> mantidas hidratadas, ou expostas a RH 33% ou <5%, a 20 °C (mesmos dados que a Figura 20) ou a 4 °C. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	67
Figura 23 - Fotografia capturada na estratosfera durante a ascensão do primeiro voo do balão.	68
Figura 24 - Sobrevivência das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> e <i>D. radiodurans</i> expostas ao ambiente estratosférico. “Terra” é o controle mantido dessecado que não voou no balão. “I” e “II” se referem aos dois voos realizados, considerados como experimentos a parte. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	69
Figura 25 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> mantidas dessecadas em terra, e de amostras que foram expostas a estratosfera em dois voos de balão (I e II).	70
Figura 26 - Foto da câmara de simulação sendo operada com o simulador solar ligado.	71
Figura 27 - Sobrevivência das cepas 281 e 158 de <i>P. syringae</i> à simulação multiparamétrica do ambiente em uma altitude de cerca de 10 km, sem radiação solar. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio L _{NP} com sorbitol.....	39
Tabela 2 - F ₁₀ estimadas a partir das curvas de sobrevivência ao UV-C e UV-B.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM1 – Filtro *Air Mass 1*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica em 600 nm por um caminho óptico de 10 mm

F₁₀ – Fluência que deixa 10% da população sobrevivente

KB – Meio B de King

NAG – Meio ágar nutriente com 2,5% de glicerol

pv. – Patovar

RH – *Relative humidity* (umidade relativa)

ROS – *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

TSA – Ágar de soja tríptica

UFC – Unidades formadoras de colônia

UV – Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 <i>Pseudomonas syringae</i>	15
2.2 Super-resfriamento da água e nucleação de gelo.....	16
2.3 Nucleação de gelo biológica	19
2.4 Bactérias nucleadoras de gelo.....	23
2.5 Interações entre bioaerossóis e nuvens	26
2.6 O ambiente atmosférico	30
2.7 <i>Pseudomonas syringae</i> na atmosfera	32
2.8 Medição da nucleação de gelo em laboratório	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Culturas	38
4.2 Ensaios com radiação ultravioleta	40
4.3 Experimentos de dessecação	43
4.4 Ensaios de atividade de nucleação de gelo.....	43
4.5 Experimentos em voos de balão de grande altitude	46
4.6 Experimentos com câmara de simulação ambiental multiparamétrica	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Culturas e nucleação de gelo.....	49
5.2 Radiação ultravioleta	51
5.3 Dessecação	62
5.4 Balão estratosférico	67
5.5 Câmara de simulação	70

6 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	
A - Aplicações biotecnológicas da nucleação de gelo biológica	92
B - Isolamentos de amostras de neve coletadas na Antártica	95

1 INTRODUÇÃO

Nos anos 70, cientistas atmosféricos estudavam o papel de partículas de origem biológica que poderiam atuar como núcleos de gelo em nuvens, impactando processos de precipitação como chuva, neve, e granizo. Eventualmente, traçaram a atividade até folhas de árvores decíduas em decomposição sobre o solo. Deste material, uma cepa da bactéria *Pseudomonas syringae* que era capaz de interferir no congelamento da água foi isolada (MAKI et al., 1974; SCHNELL; VALI, 1972). Na mesma época, outro grupo de pesquisadores buscava um fator presente nas folhas do milho que sensibilizava os cultivos a danos de geada. Novamente, cepas de *P. syringae* foram identificadas como as responsáveis por este fenômeno, induzindo a formação de gelo sobre as plantas e lesionando o tecido vegetal (ARNY; LINDOW; UPPER, 1976). A partir disto, surgiu a área de pesquisa científica da nucleação de gelo biológica, frequentemente centrada nesta bactéria, e com interesses espalhados pela meteorologia, fitopatologia, biologia molecular, e biotecnologia, entre outros campos. Outros organismos com esta atividade distinta foram identificados desde então.

Uma das questões mais intrigantes levantadas pela descoberta da nucleação de gelo em bactérias seja a possibilidade destes microrganismos afetarem diretamente fenômenos atmosféricos, com implicações para a dispersão destas células pelo ambiente através do ar (MORRIS et al., 2014; SANDS et al., 1982). Esta hipótese é corroborada pela abundância de *Pseudomonas* encontradas em amostras de precipitação e até mesmo de água de nuvens (AMATO et al., 2007; MORRIS et al., 2008; VAÏTILINGOM et al., 2012; por exemplo). Entretanto, o ambiente da atmosfera é repleto de fatores estressantes para células, como a radiação solar. Assim, é de interesse estudar como estes organismos podem sobreviver travessias pelas camadas de ar conservando sua atividade de congelamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Pseudomonas syringae*

A bactéria Gram-negativa, heterotrófica, e aeróbica estrita *Pseudomonas syringae* van Hall 1902 (Classe Gammaproteobacteria) é um componente comum de comunidades microbianas epifíticas. Coloniza as folhas e outras partes aéreas de diferentes espécies vegetais e, oportunamente, pode ocasionar efeitos fitopatogênicos diversos. A espécie *P. syringae* como um todo possui uma grande variedade de plantas

hospedeiras. Contudo, muitas de suas cepas são tipicamente restritas a um grupo específico de hospedeiros potenciais, e assim são diferenciadas como patovares, ou “pv.” (HIRANO; UPPER, 2000). Muitos trabalhos com esta bactéria focam principalmente em sua patogenicidade em plantas, justificados pelo seu significativo impacto na agricultura.

P. syringae é responsável por um grande número de doenças como manchas, pintas, e queimas em uma série extensa de espécies cultivadas comercialmente importantes, incluindo feijão, soja, tomate, trigo e café (GNANAMANICKAM; IMMANUEL, 2006; SARKAR; GUTTMAN, 2004). Schroth, Hildebrand, e Panopoulos (2006) afirmam que há aproximadamente 25 espécies do gênero *Pseudomonas* fitopatogênicas, com 50 patovares sendo apenas de *P. syringae*. A capacidade de infecção desta bactéria está relacionada com a presença de seu sistema de secreção tipo III, um grande complexo proteico que atravessa suas membranas interna e externa, codificado pelo *cluster* de genes *hrp*. Este sistema é utilizado para a translocação de proteínas efetoras diretamente para as células do hospedeiro, onde atuam para suprimir as defesas da planta e promover o avanço da doença. Em uma planta não-hospedeira, com quantidades suficientes destas bactérias, este sistema pode induzir a chamada resposta hipersensível, que envolve a rápida morte de células do tecido afetado inibindo a propagação da infecção (JIN et al., 2003).

A nucleação de gelo biológica foi originalmente identificada em bactérias da espécie *P. syringae* (MAKI et al., 1974). Sua relação com os danos de geada, a formação de gelo sobre a folhagem quando sujeitas à baixa temperatura, foi estabelecida em trabalhos subsequentes (ARNY; LINDOW; UPPER, 1976). Isto revelou uma influência adicional que estes microrganismos poderiam ter sobre a atividade agrícola, e passou a ser outro importante alvo dos estudos com cepas de *Pseudomonas* e de outras bactérias da filosfera com esta propriedade.

2.2 Super-resfriamento da água e nucleação de gelo

Abaixo de 0 °C, o congelamento da água é favorecido termodinamicamente. Contudo, esta mudança de fase é limitada pela probabilidade de formação de aglomerados de moléculas estruturados de maneira semelhante ao gelo – os chamados “embriões de gelo”. Estes arranjos são necessários para atuarem como moldes sobre os quais as demais moléculas de água se alinham para formar um cristal de gelo. A tensão

superficial na interface sólido-líquido destes aglomerados (a energia livre de superfície) leva a sua desintegração, impedindo o seu crescimento e, por consequência, o congelamento da solução. Desta forma, a água entra em um estado metaestável chamado de super-resfriamento, que pode se estender a até dezenas de graus abaixo do seu ponto de fusão. Para haver a formação do gelo, os embriões devem conseguir atingir um volume suficiente para que a energia de cristalização (favorável à transformação) sobrepuje a tensão superficial (desfavorável). Assim, há um tamanho crítico para os aglomerados serem capazes de crescer e desencadear o congelamento, constituindo efetivamente uma barreira de ativação para esta transformação (MARGARITIS; BASSI, 1991; PUMMER et al., 2015; VALI, 1995). Este tamanho é dependente da temperatura: calcula-se que a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ seja equivalente a 45000 moléculas de água organizadas, enquanto que a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ seja de 650 moléculas, e a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ apenas 70 moléculas (VALI, 1995). Quando a água é capaz de espontaneamente formar embriões de gelo efetivos e mudar de fase, é dito que houve nucleação homogênea do líquido. Para volumes pequenos, isto normalmente só ocorre em temperaturas consideravelmente baixas, com um limite entre aproximadamente -38 e $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na natureza, entretanto, a água frequentemente contém impurezas que influenciam diretamente este processo.

Um fator que afeta de maneira decisiva a probabilidade de congelamento é a presença de algum material que facilite a formação e crescimento dos embriões de gelo. Isto pode ocorrer por estruturas – nucleadoras de gelo – que são capazes de organizar, por interações moleculares como ligações de hidrogênio, as moléculas de água de forma similar ao arranjo cristalino do gelo. Desta maneira, a energia livre de superfície é reduzida, efetivamente catalisando a mudança de fase. A este processo, é dado o nome de nucleação heterogênea. Quanto maior (com mais moléculas) for o aglomerado de água que o núcleo de gelo conseguir estabilizar, maior será a temperatura em que apresentará atividade (PUMMER et al., 2015; VALI, 1995). Pela nomenclatura utilizada nas ciências atmosféricas, quando o congelamento ocorre a partir de partículas em suspensão na fase líquida, diz-se que a nucleação heterogênea ocorreu no modo de imersão (MURRAY et al., 2012).

A Figura 1 ilustra a barreira de ativação para o congelamento da água em uma dada temperatura ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ neste exemplo) como a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) para a nucleação homogênea e heterogênea, indicando o tamanho crítico do embrião de gelo a partir do qual o crescimento da fase cristalina é desimpedido (LOHMANN;

LÜÖND; MAHRT, 2016). Para este valor de ΔG total para a transformação, contribuem os termos de energia livre relativos ao volume e a área superficial dos embriões. Essencialmente, pode-se observar como a barreira é reduzida na presença de um material nucleador moderadamente eficiente. Quanto mais eficiente for este núcleo, menor será a barreira, o que se traduz como a viabilização de uma mudança de fase em temperaturas em que dificilmente poderia ocorrer.

Figura 1 - Ilustração da barreira de energia livre de Gibbs (ΔG) para o congelamento homogêneo e heterogêneo da água, com indicação do tamanho crítico do embrião de gelo necessário para a nucleação.

Fonte: Adaptado de Lohmann, Lüönd, e Mahrt (2016).

Vonnegut (1947) buscou substâncias com estrutura cristalográfica semelhante ao gelo que pudessem agir como nucleadoras, partindo da hipótese de que seriam mais eficientes em organizar as moléculas de água de maneira a promover a sua cristalização. Foi descoberto que partículas de iodeto de prata (AgI) eram capazes de atuar desta maneira a $-4^\circ C$, quando produzidas em determinada faixa de tamanho. Este composto passou a ser estudado como ferramenta para manipular o congelamento da água em nuvens, com o objetivo de controlar o clima, sendo que por anos não se encontraria outra substância natural ou artificial tão ativa (MASON, 1961). Estudos mostraram que materiais existentes no ambiente, como diferentes minerais, incluindo certas argilas, também poderiam apresentar alguma capacidade de nuclear gelo, mas geralmente em

temperaturas inferiores, ou seja, mais frias, do que o AgI produzido em laboratório. Eventualmente, se descobriu os núcleos biológicos como os de *P. syringae*, que se mostraram excepcionalmente eficientes neste processo (MURRAY et al., 2012).

É válido explicitar que o super-resfriamento é um fenômeno distinto do abaixamento do ponto de fusão causado por solutos (sais, por exemplo), que afetam as propriedades coligativas da água e dificultam o seu congelamento. A presença destas substâncias influencia a chamada atividade da água, que é definida como a razão entre a pressão de vapor da solução e a pressão de vapor da água pura. Este parâmetro afeta proporcionalmente as temperaturas de nucleação homogênea e heterogênea, que são reduzidas em conjunto com um aumento na concentração de solutos (KOOP; ZOBRIST, 2009).

2.3 Nucleação de gelo biológica

A atividade de nucleação de gelo (heterogênea) de *P. syringae* decorre de uma proteína originalmente identificada como o produto do gene *inaZ*. Variantes desta sequência foram descobertas subsequentemente em outras cepas e espécies, coletivamente chamados de genes *ina*. InaZ é uma proteína relativamente grande, com 1200 aminoácidos e uma massa molecular de aproximadamente 118,6 kilodaltons. A porção central de sua estrutura primária, maior e mais conservada, constitui sua região de atividade. Notavelmente, esta região apresenta um padrão periódico que, de maneira resumida, pode ser descrito como composto por cerca de 120 repetições imperfeitas contíguas dos resíduos de aminoácidos consenso Ala-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-Leu-Thr (GREEN; WARREN, 1985; WOLBER et al., 1986). Nas células, esta proteína se localiza na membrana externa bacteriana, mesmo quando expressa heterologicamente em *E. coli* (LINDOW et al., 1989; PALAIOMYLITOU et al., 1998). Esta ancoragem é realizada pela região N-terminal da sequência, enquanto o domínio C-terminal é hidrofílico e fica exposto ao meio externo (VAN BLOOIS et al., 2011). Foi demonstrado que o ambiente hidrofóbico da membrana é essencial para a máxima nucleação de gelo: estas proteínas requerem estar na presença de fosfolipídios para apresentarem atividade de congelamento significativa (GOVINDARAJAN; LINDOW, 1988a).

Além destes fatores, o mecanismo de formação dos núcleos depende da agregação destas proteínas na superfície da célula. Foi estimado que monômeros da proteína de

nucleação de gelo só apresentariam atividade a cerca de -13 °C. Através da formação de agregados com várias dezenas de proteínas, os sítios de nucleação se tornam maiores e funcionais a temperaturas mais altas, podendo catalisar o congelamento a até -2 °C (GOVINDARAJAN; LINDOW, 1988b; MUELLER; WOLBER; WARREN, 1990; RUGGLES; NEMECEK-MARSHALL; FALL, 1993). Isto é entendido como um aumento da área que interage efetivamente com a água, permitindo a organização de mais moléculas em uma superfície ativa maior, formando um embrião de gelo de tamanho suficiente para desencadear a nucleação (GRAETHER; JIA, 2001; GARNHAM et al., 2011). Alguns trabalhos propuseram também modificações químicas secundárias nas proteínas (glicosilação e ligação com o lipídio fosfatidilinositol) para a formação dos núcleos (TURNER; ARELLANO; KOZLOFF, 1991, por exemplo). Contudo, isto não foi corroborado por análises posteriores (GURIAN-SHERMAN; LINDOW, 1992; SCHMID et al., 1997).

Ainda não foi determinada experimentalmente a estrutura tridimensional de uma proteína de nucleação de gelo como InaZ. Dois trabalhos propõem por métodos computacionais um modelo alongado, em beta-hélice (folhas-beta paralelas em um padrão helicoidal), da região central repetitiva destas biomoléculas (Figura 2, GRAETHER; JIA, 2001; GARNHAM et al., 2011). Estes autores sugerem um papel crucial dos resíduos de treonina dispostos periodicamente na sua estrutura. Os seus grupos hidroxila participariam na ordenação de moléculas de água na sua superfície através da formação de pontes de hidrogênio, da onde se originaria a atividade de nucleação. Isto foi posteriormente evidenciado por Pandey e colaboradores (2016) por técnicas espectroscópicas, onde observaram sinais de organização da água em contato com estas proteínas. Curiosamente, estes trabalhos de biologia estrutural apontaram semelhanças com as estruturas conhecidas de algumas proteínas anticongelantes, que também têm a propriedade de se ligar a moléculas de água no arranjo cristalino do gelo. Adicionalmente, Garnham e colaboradores (2011) também identificam elementos do modelo tridimensional que permitiriam a dimerização e multimerização destas proteínas por interações hidrofóbicas entre resíduos de tirosina empilhados ao longo da beta-hélice. Isto poderia explicar o mecanismo de formação dos agregados sobre as membranas das células que originam os núcleos mais eficientes.

Figura 2 - Modelo de estrutura proposto para uma porção (cerca de 1/8) da região central de proteínas de nucleação de gelo bacterianas.

Fonte: Adaptado de Garnham et al. (2011).

Os núcleos de gelo formados, mesmo em populações clonais de células, habitualmente apresentam uma distribuição que varia dos mais ativos e menos frequentes, até os menos ativos e mais frequentes. Assim, o que comumente se observa é uma concentração proporcionalmente menor, presentes em menos células, de núcleos ativos em temperaturas mais altas. Yankofsky e colaboradores (1981) propõe uma classificação dos núcleos de gelo com base nestas características. Os de tipo I catalisam o congelamento da água super-resfriada acima de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, e tendem a ser os mais raros; os de tipo II, intermediários, agem entre -5 e $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$; enquanto os de tipo III são ativos abaixo de $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uma explicação para esta distribuição ocorrer em populações supostamente homogêneas é a variação no tamanho dos agregados de proteínas de nucleação de gelo em cada célula (MUELLER; WOLBER; WARREN, 1990). Esta variação não depende exclusivamente de níveis de expressão, mas também de parâmetros físico-químicos que afetam as membranas e ditam a formação e estabilidade dos agregados (RUGGLES; NEMECEK-MARSHALL; FALL, 1993; LINDOW, 1995). Assim, a formação dos núcleos do tipo I, compostos de um número maior de proteínas, pode ser entendida como um processo mais complexo, sujeito a mais limitações, do que os que dão origem aos do tipo II e III, com menos subunidades.

O papel da temperatura na nucleação de gelo por *P. syringae* é relativamente bem conhecido. Temperaturas mais baixas favorecem a manutenção e maior expressão da

atividade de congelamento, com um valor ótimo entre 15 e 20 °C. O calor (acima de 25-30 °C), por outro lado, leva a uma diminuição desta atividade (GURIAN-SHERMAN; LINDOW, 1995; MUELLER; WOLBER; WARREN, 1990; NEMECEK-MARSHALL; LADUCA; FALL, 1993; RUGGLES; NEMECEK-MARSHALL; FALL, 1993). Neste processo é observada uma maior instabilidade dos núcleos mais eficientes (os de tipo I). Isto é, o congelamento mais próximo de 0 °C é abolido primeiro, mais rapidamente, enquanto que a atividade próxima a -10 °C se mantém por mais tempo sob o calor. Este fenômeno é interpretado como função da menor estabilidade dos agregados maiores de proteína, justamente os que constituem os núcleos mais ativos. Assim, os núcleos de tipo II e tipo III são capazes de persistir mais nestas condições, podendo ser formados pela desintegração dos de tipo I. A Figura 3 ilustra este processo. A capacidade de nucleação perdida pode ser recuperada com incubação a baixa temperatura, em um processo que envolve reagregação dos monômeros e nova síntese de proteínas (NEMECEK-MARSHALL; LADUCA; FALL, 1993; RUGGLES; NEMECEK-MARSHALL; FALL, 1993).

Figura 3 - Ilustração do processo de formação e destruição dos núcleos de gelo mais eficientes na superfície das células a partir das proteínas de nucleação de gelo (apresentadas esquematicamente como hexágonos).

Fonte: Adaptado de Ruggles, Nemecek-Marshall, e Fall (1993).

Outro fator conhecido por afetar a nucleação de gelo em culturas de bactérias é a disponibilidade de nutrientes no meio. Uma taxa de crescimento desacelerada em um meio mínimo com a limitação de certos componentes (nitrogênio em particular) aumenta a expressão de núcleos tipo I em *P. syringae* (NEMECEK-MARSHALL; LADUCA; FALL, 1993; POOLEY; BROWN, 1991). Em células recolhidas de folhas

de plantas, que são ambientes que também podem ser pobres em determinados nutrientes, a frequência de congelamento em temperaturas altas tende a ser muito maior do que culturas em meio rico e complexo (O'BRIEN; LINDOW, 1988). Um fato interessante é que estas condições nutricionais para alta expressão dos núcleos de gelo se assemelham à regulação dos genes determinantes de patogenicidade *hrp* (WEI; SNEATH; BEER, 1992; YUCEL; XIAO; HUTCHESON, 1989). Temperaturas mais baixas do que as ideais para o crescimento, como as que favorecem a nucleação (descrito acima), também induzem o sistema de secreção tipo III, que é produto destes genes *hrp* (VAN DIJK et al., 1999). Isto permite supor possíveis relações entre a atividade de congelamento e a infecção de tecidos vegetais, como será comentado adiante sobre os danos de geada (WOLBER, 1991).

2.4 Bactérias nucleadoras de gelo

As bactérias com atividade de nucleação de gelo mais estudadas são Gram-negativas, todas membros da classe das gamaproteobactérias, ou seja, filogeneticamente próximas de *P. syringae*. Pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, e a espécies antes classificadas como *Erwinia* (HIRANO; UPPER, 1995), atualmente classificadas como *Pantoea* (consultadas no LPSN – List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature; PARTE, 2014). Todas as 8 sequências de proteínas de congelamento bacterianas publicadas e com atividade experimentalmente verificada disponíveis na base de dados online UniProt apresentam homologia com InaZ e pertencem a membros deste grupo (Figura 4, CID et al., 2016; UNIPROT CONSORTIUM, 2017). A maioria destes organismos também é conhecida por sua associação com superfícies de plantas, e possível fitopatogênese, indicando também uma proximidade ecológica entre suas linhagens (HIRANO; UPPER, 1995; LORV; ROSE; GLICK, 2014).

Figura 4 - Árvore das relações filogenéticas entre as sequências de proteínas de nucleação de gelo com função experimentalmente verificada (em vermelho) e apenas putativa (em preto), disponíveis na base de dados UniProt.

Fonte: Cid et al. (2016).

Bactérias nucleadoras de gelo são as principais causadoras da formação de gelo em superfícies vegetais, a geada, em temperaturas acima (mais quentes) de -5°C . Plantas crescidas em estufas, relativamente livres de microrganismos, não congelam até temperaturas muito mais baixas (LINDOW; ARNY; UPPER, 1982; LINDOW, 1983). Por exemplo, Huang e colaboradores (2002) observaram o super-resfriamento de *Arabidopsis* até abaixo de -12°C . Após se formar na superfície da planta, o gelo se propaga ao interior do vegetal por aberturas (como estômatos) e pelo espaço extracelular, onde os danos no tecido podem ocorrer, dependendo da sensibilidade da

variedade. A possibilidade de dano é maior com o aumento da concentração de bactérias nucleadoras (HIRANO; UPPER, 2000; SNYDER; MELO-ABREU, 2005). Desta maneira, bactérias como *P. syringae* apresentam não apenas um risco de doenças nos cultivos, mas também podem amplificar a ameaça de fenômenos meteorológicos adversos como a geada.

Dentro dos gêneros mencionados, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, e *Pantoea*, apenas algumas de suas espécies, e nem todas as suas respectivas cepas, possuem um gene como *inaZ* e expressam a capacidade de catalisar o congelamento da água. Edwards e colaboradores (1994) constataram que uma filogenia destes organismos baseada nos genes de nucleação de gelo não coincide com suas relações estabelecidas pela sequência do RNA ribossomal 16S. Isto sugere sua possível aquisição via transferência horizontal, como proposto por Wolber (1991). O local desta troca gênica seria a justamente o ambiente que todas estas bactérias comumente habitam: a filosfera. Wolber (1991) desenvolve este argumento com uma hipótese de que o surgimento e seleção deste fenótipo decorreram de uma vantagem competitiva das bactérias nucleadoras nas superfícies vegetais em condições de clima moderadamente frio. Induzindo danos por geadas, estes organismos seriam favorecidos pela liberação de nutrientes do apoplasto e também pela abertura de uma via de infecção da planta pelos tecidos lesionados. Esta capacidade de atuar como fator de virulência permanece como uma alternativa plausível para a evolução da nucleação de gelo biológica (HIRANO; UPPER, 1995; PUMMER et al., 2015).

Além de plantas, outros nichos nos quais estas bactérias nucleadoras também foram isoladas são solos, ambientes polares, marinhos, e de água doce (FALL; SCHNELL, 1985; HIRANO; UPPER, 1995; LORV; ROSE; GLICK, 2014; MAKI; WILLOUGHBY, 1978; MORRIS et al., 2008; MORRIS; MONTEIL; BERGE, 2013; PIETSCH; VINATZER; SCHMALE III, 2017; WILSON; KELLEY; WALKER, 2006; entre outros trabalhos). Fora os procariotos, espécies bastante distintas já tiveram esta atividade descrita, como fungos parasíticos (GONÇALVES; MASSAMBANI, 2011; MORRIS et al., 2013), fungos de vida livre (POULEUR et al., 1992; FRÖHLICH-NOWOISKY et al., 2015), micobiontes de líquens (ASHWORTH; KIEFT, 1992), algas diatomáceas (KNOPF et al., 2011), pólen (DIEHL et al., 2002; PUMMER et al., 2012), entre outras. Destes organismos, os núcleos possivelmente mais ativos e bem caracterizados são produzidos por fungos ascomicetos filamentosos fitopatogênicos do

gênero *Fusarium*. Isto se restringe a apenas algumas de suas espécies, que são capazes de congelar em temperaturas acima (mais quentes) de -5 °C, semelhante às bactérias citadas anteriormente (POULEUR et al., 1992).

O estudo ao longo dos anos das bactérias nucleadoras de gelo também levantou considerável interesse prático para aplicações biotecnológicas na indústria e no campo. Um resumo destas pesquisas e dos produtos desenvolvidos ou propostos é apresentado no APÊNDICE A.

2.5 Interações entre bioaerossóis e nuvens

Os aerossóis compõe uma abundante dispersão de partículas suspensas na atmosfera. Dentre estes materiais, os bioaerossóis integram as partículas de origem biológica, uma classificação que inclui também células (viáveis ou não) de diversos microrganismos (BAUER et al., 2003; BURROWS et al., 2009; SMITH, 2013). Aerossóis, na forma de núcleos de condensação, são essenciais para o surgimento das nuvens, participando na formação das gotículas de água líquida que as compõe a partir da umidade atmosférica. A atividade destes materiais é, de certa maneira, análoga à nucleação de gelo, apesar de lidarem com transições de fases distintas. Em condições de supersaturação (umidade relativa acima de 100%), o crescimento de aglomerados de moléculas de água na fase líquida a partir do vapor é facilitado pela presença de partículas (núcleos) em que podem se adsorver e que promovem sua condensação. A Figura 5 ilustra as diferenças entre a atividade dos núcleos de condensação e de congelamento (no modo de imersão) em nuvens.

Figura 5 - Esquema da atividade dos núcleos de condensação e dos núcleos de gelo em nuvens.

Vários materiais encontrados como aerossóis na atmosfera, orgânicos e inorgânicos, naturais e antropogênicos, apresentam atividade de núcleos de condensação em níveis variados (SUN; ARIYA, 2006), o que inclui também células de microrganismos (BAUER et al., 2003; MÖHLER et al., 2007; MÖHLER et al., 2008). Algumas bactérias, incluindo *Bacillus subtilis* e espécies do gênero *Pseudomonas*, foram caracterizadas como produtoras de biossurfactantes com excepcional potencial de nuclear condensação em nuvens (AHERN et al., 2007; EKSTROM et al., 2010; RENARD et al., 2016).

As parcelas de ar dentro das nuvens, ao atingirem camadas de ar mais frias em maior altitude, constituem um ambiente em que água está sujeita a um super-resfriamento profundo. Heymsfield e Miloshevich (1993), por exemplo, relataram gotículas de água líquida a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ nestas condições. Observações por satélite mostram que em nuvens, em uma média global, mais da metade da água permanece como líquido super-resfriado a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, com esta fração caindo para cerca de um quarto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 6, TAN; STORELVMO; CHOI; 2014). Portanto, outro papel importante dos

aerossóis na atmosfera é sua capacidade de atuarem como nucleadores de gelo, mudando o balanço entre a água na fase líquida e sólida nestas condições (Figura 5).

Figura 6 - Frações super-resfriadas médias de nuvens (*supercooled cloud fractions*, SCF) sobre diferentes porções do globo.

Fonte: Adaptado de Tan, Storelvmo, e Choi (2014).

A concentração de aerossóis capazes de atuar como núcleos de congelamento em nuvens é frequentemente ordens de magnitude inferior a de núcleos de condensação (FAN et al., 2016; MURRAY et al., 2012). Contudo, transformações podem ocorrer rapidamente em nuvens abaixo de 0 °C devido a metaestabilidade da água super-resfriada. Nestas condições, a pressão de vapor sobre os cristais de gelo é menor do que em relação à água líquida. Desta forma, as partículas congeladas podem crescer de maneira eficiente consumindo através da fase gasosa a umidade das gotículas líquidas, por meio do que é conhecido como processo de Wegener-Bergeron-Findeisen (MASON, 1961; MURRAY et al., 2012). Este processo favorece a formação de partículas de gelo maiores, com massa suficiente para se depositar da atmosfera (como chuva ou neve, por exemplo, dependendo da temperatura das camadas de ar subjacentes), como ilustrado na Figura 7. Assim, como consequência da formação de gelo nas nuvens, a chamada glaciação, a probabilidade de precipitação aumenta (LOHMANN; FEITCHER, 2005; STORELVMO; HOOSE; ERIKSSON, 2011). De fato, medições por satélite apontam que nuvens com fases congeladas são as principais fontes de chuva sobre áreas continentais (MÜLMENSTÄDT et al., 2015). Uma alternativa a este mecanismo de “chuva fria” seria a “chuva quente”, decorrente

exclusivamente da fase líquida. Nela, as gotas de precipitação se originam da colisão e coalescência de gotículas de água menores formadas pelos núcleos de condensação (MÖHLER et al., 2007). Isto tende a ocorrer mais comumente sobre oceanos em regiões tropicais (MÜLMENSTÄDT et al., 2015).

Figura 7 - Esquema do processo de Wegener-Bergeron-Findeisen para a formação da precipitação.

A maioria dos materiais encontrados em grande quantidade na atmosfera, como fragmentos de minerais, poeira de desertos, cinzas vulcânicas, e fuligem, começam a apresentar atividade de nucleação de gelo apenas abaixo de cerca de $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por outro lado, apesar de menos comuns, núcleos de gelo biológicos como os produzidos por *P. syringae* são ativos em temperaturas mais altas, até $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MURRAY et al., 2012). Estas bactérias podem também contribuir para mecanismos de multiplicação do gelo nas nuvens. O processo de Hallett-Mossop é de especial relevância neste caso, pois ocorre entre -3 e $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, justamente a faixa em que são ativas. Neste processo, gotículas de água líquida se solidificam ao se chocarem com as partículas de gelo, formando um recobrimento congelado. Este recobrimento se fragmenta, produzindo estilhaços, o que pode amplificar em várias ordens de magnitude a concentração de partículas de gelo presentes na nuvem (HALLETT; MOSSOP, 1974; MORRIS et al., 2014). Portanto, células de *P. syringae* podem ser especialmente eficientes na glaciação atmosférica, impactando por consequência fatores como a precipitação. Isto torna estas bactérias organismos de especial interesse para o estudo das interações entre a biosfera e a atmosfera.

2.6 O ambiente atmosférico

A atmosfera já foi descrita como uma das últimas fronteiras de exploração biológica na Terra (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2000). A aerobiologia, o estudo das partículas biológicas em suspensão no ar, vem há várias décadas demonstrando a dispersão de células vivas por este meio. Estima-se uma concentração típica de mais de 10 mil bactérias por metro cúbico de ar sobre o solo, mas este valor pode variar de acordo com as condições climáticas, época do ano, altitude, e o ecossistema em que se localiza (BAUER et al., 2002; BURROWS et al., 2009). Enquanto microrganismos podem influenciar processos na atmosfera (como descrito anteriormente), o ambiente atmosférico também exerce forte influência sobre as células. Em especial, pode-se destacar a ação da dessecação e do ultravioleta solar como importantes fatores deletérios (ROTHSCHILD; MANCINELLI, 2000). Como tendência geral, estas condições se agravam ao se ascender pelas camadas de ar. Com a altitude, a intensidade de UV aumenta (BLUMTHALER; AMBACH; REHWALD, 1992), e a temperatura, pressão barométrica e a umidade decrescem (MANABE; WETHERALD, 1967).

Se estendendo do solo até uma altitude de 8 a 16 km, a troposfera constitui a camada mais baixa da atmosfera terrestre (Figura 8). Nela, está presente a maior porcentagem de sua massa e de sua umidade. É onde ocorrem quase todos os processos caracterizados como clima, como as nuvens e a precipitação. Nesta camada, a temperatura decai com a altitude, até atingir valores próximos de -60 °C em seu topo, a tropopausa (HORNECK; KLAUS; MANCINELLI, 2010; SCHLATTER, 2010). O ultravioleta da radiação solar que cruza a troposfera é reconhecido como um fator deletério para bactérias suspensas no ar (PAEZ-RUBIO; PECCIA, 2005). É composto pelas faixas do UV-A (320–400 nm) e do UV-B (280–320 nm), sendo que o UV-B é mais energético e capaz de causar danos diretos no material genético das células. A faixa do UV-C (200–280 nm) é fortemente reduzida acima da troposfera, e é integralmente absorvida antes de atingir o solo.

Figura 8 - Estrutura vertical da atmosfera terrestre, com a temperatura apresentada pela linha cheia e a pressão pelo pontilhado.

Fonte: Adaptado de Yang, Yokobori, e Yamagishi (2009).

Acima da troposfera, se encontra a estratosfera (Figura 8). A maior parte da sua extensão se encontra a dezenas de graus negativos, se aproximando de 0 °C apenas em seu topo, a estratopausa (a cerca de 50 km de altitude). A pressão na estratosfera é de 10 a 1000 x menor que ao nível do mar. Além disto, este ar rarefeito é também extremamente seco. Nesta camada há a formação de ozônio a partir da reação do oxigênio atmosférico com o ultravioleta solar. Nela, está presente também a faixa do UV-C (200-280 nm), citada acima, ainda mais danosa a seres vivos (HORNECK; KLAUS; MANCINELLI, 2010; SCHLATTER, 2010). Por estas características, a

estratosfera já foi proposta como um ambiente extremo semelhante à superfície do planeta Marte (SMITH, 2013).

Apesar das condições deletérias presentes além da troposfera, microrganismos viáveis já foram recuperados desta região em várias missões ao longo dos anos, principalmente através de voos de balão. Os isolados encontrados incluem bactérias esporulantes, fungos, e também espécies relacionadas à extremófilos como *Deinococcus* (SMITH, 2013; YANG; YOKOBORI; YAMAGISHI, 2009). As maiores altitudes já registradas em que organismos vivos foram coletados são entre 48 e 77 km de altura, na região conhecida como mesosfera (de 50 até acima de 80 km, Figura 8), tendo sido amostrados por foguetes de sondagem meteorológica (IMSHENETSKY; LYSSENKO; KAZAKOV, 1978). Apesar de estes autores terem proposto esta como a “barreira superior da biosfera”, cientistas associados à agência espacial japonesa estão atualmente estudando o potencial de se coletar material biológico ainda mais distante da superfície. Com a missão Tanpopo, um módulo de coleta em aerogel foi instalado na parte externa da Estação Espacial Internacional, orbitando a baixa órbita terrestre a cerca de 400 km de altitude. Um dos temas investigados neste experimento é a possibilidade de microrganismos terrestres atingirem estas alturas e serem coletados pelo módulo, em uma região que já pode ser considerada espaço exterior (KAWAGUCHI et al., 2016)

A passagem de partículas para acima da troposfera é geralmente limitada, mas pode ocorrer por diferentes mecanismos meteorológicos, como fortes tempestades. Adicionalmente, erupções vulcânicas e grandes impactos de meteoros também podem levar material até estas altitudes (KAWAGUCHI et al., 2016; SMITH, 2011).

2.7 *Pseudomonas syringae* na atmosfera

Foi demonstrado que em dias secos e ensolarados, com o movimento convectivo vertical do ar, as copas de plantas são importantes fontes de bactérias em suspensão, incluindo nucleadoras de gelo (LINDEMANN et al., 1982; LINDEMANN; UPPER, 1985). Joung, Ge, e Buie (2017) demonstraram recentemente que *P. syringae* e outras bactérias podem também ser aerossolizadas a partir do solo com o impacto de gotas de chuva. Um mecanismo semelhante já havia sido proposto para a dispersão de células epifíticas desta espécie no campo, através da colisão das gotas com folhas de plantas (CONSTANTINIDOU et al., 1990; ERCOLANI et al., 1974). Além destes trabalhos, Pietsch e colaboradores (2015) estudaram a aerossolização de *P. syringae* a partir de

ambientes de água doce, onde se sabe que esta espécie pode também estar presente. Desta forma, estas bactérias podem ser transportadas para a atmosfera a partir de diferentes habitats e sob diferentes condições climáticas.

Bactérias com atividade de nucleação de gelo viáveis já foram recuperadas na altitude das nuvens, como descrito em diversos trabalhos (AMATO et al., 2007; JAYAWEERA; FLANAGAN, 1982; JOLY et al., 2013; SANDS et al., 1982). Membros do gênero *Pseudomonas* foram os mais frequentemente isolados de amostras de água de nuvens coletadas a 1465 m de altura na França ao longo de 4 anos (VAÏTILINGOM et al., 2012). De maneira semelhante, Renard e colaboradores (2016), no mesmo ponto de coleta, também reportaram este gênero como o mais abundante. Isolados de *Pseudomonas* spp. foram recuperados de amostras de nuvens na Escócia, mas estes isolados, entretanto, não apresentaram atividade de nucleação de gelo (AHERN et al., 2007).

Partículas com dimensões de células de bactérias, com baixa taxa de sedimentação, possuem um tempo residência na atmosfera na ordem de dias, durante o qual tem potencial de cruzar grandes distâncias (BURROWS et al., 2009; WILKINSON et al., 2012). Contudo, a altitude é um ambiente estressante para células. O ar rarefeito dessecante e a exposição à intensa radiação ultravioleta solar são fatores deletérios que precisam tolerar para poderem retornar ao solo ainda viáveis (como mencionado anteriormente). Mesmo dentro de nuvens, presumivelmente mais protegidas, também estão sujeitas a baixas temperaturas, congelamento, e estresses químicos, como pH ácido e espécies oxidantes (DELORT et al., 2017). Um mecanismo eficiente de escape desta situação seria através da precipitação, cuja formação pode ser favorecida pela nucleação de gelo através do processo de Wegener-Bergeron-Findeisen, como descrito anteriormente. Estudos realizados em laboratório e no ambiente já indicaram que células com esta atividade podem sofrer uma deposição preferencial, mais rápida, através destes chamados processos úmidos em que as partículas estão imersas em água (AMATO et al., 2015; STOPELLI et al., 2015; STOPELLI et al., 2017). Desta forma, uma redução no tempo de residência é uma evidente vantagem para *P. syringae* e outros organismos capazes de catalisar o congelamento da água neste ambiente.

Por fim, em múltiplos estudos, *P. syringae* e outras bactérias nucleadoras já foram encontradas presentes em amostras de chuva, neve, e granizo (CONSTANTINIDOU et

al., 1990; HARA et al., 2016.; HILL et al., 2014; MAKI; WILLOUGHBY, 1978; MICHAUD et al., 2014; MONTEIL; BARDIN; MORRIS, 2014; MORRIS et al., 2008; SANDS et al., 1982; ŠANTL-TEMKIV et al., 2015; STOPELLI et al., 2017; WATURANGI, 2011; por exemplo). Foi mostrado que em diversas amostras de precipitação coletadas em três continentes em latitudes médias e altas apresentaram frequentemente atividade de nucleação de gelo acima de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, muito maior do que o esperado para materiais abióticos (CHRISTNER et al., 2008a; CHRISTNER et al., 2008b). O tratamento destas amostras com lisozima (para a lise de bactérias) ou com calor (para desnaturação de proteínas) reduziu significativamente, ou aboliu por completo, esta atividade, também sugerindo sua biogenicidade. Estes resultados apontam para uma grande distribuição de núcleos biológicos de gelo na precipitação ao redor do globo.

Com estas informações disponíveis na literatura, fica evidenciado que estas bactérias têm potencial de serem transportadas para grandes altitudes, onde podem interagir com determinados processos nas nuvens, e serem novamente depositados em associação com a precipitação. A chamada hipótese da bioprecipitação propõe a partir disto que microrganismos com atividade de nucleação de gelo seriam capazes de ativamente interferir no ciclo hidrológico, afetando a sua evolução, dispersão, e os ecossistemas que habitam (MORRIS et al., 2014; SANDS et al., 1982). A verdadeira extensão disto ainda está para ser elucidada, incluindo o que se relaciona à física de nuvens, à biologia dos organismos nucleadores, e sua relevância em escala regional e global. Há uma área ativa de pesquisa que tenta compreender melhor estas questões, e a qual novos trabalhos com *P. syringae* podem contribuir.

2.8 Medição da nucleação de gelo em laboratório

Várias metodologias diferentes podem ser encontradas na literatura para a medição da atividade de nucleação de gelo heterogênea, em modo de imersão, de uma amostra. A maioria, contudo, deriva da técnica desenvolvida por Vali (1971), que será elaborada na sequência com base em Vali (1995).

O congelamento de uma amostra apenas revela a temperatura de atividade do núcleo de gelo mais eficiente presente nela. Assim, para se obter um espectro mais completo dos seus núcleos, deve-se fracionar e diluir a amostra em várias partes, dispersando-se em porções os núcleos mais e menos ativos. Na prática, isto é realizado se testando

várias gotas, alíquotas de uma suspensão do material analisado (bactérias ou minerais, por exemplo), em que os núcleos podem ser separados, distribuídos aleatoriamente. As diluições são necessárias, pois a frequência dos núcleos ativos em diferentes temperaturas pode variar em muitas ordens de grandeza. Os volumes escolhidos tendem a ser pequenos, na faixa dos microlitros (μl). Isto se justifica por sua menor chance de conter impurezas, e pelo fato de que volumes maiores de água tem maior probabilidade de sofrer nucleação homogênea (o que é mais relevante para temperaturas abaixo de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$). A superfície em que as gotas estão depositadas também pode influenciar este processo. Por isso, idealmente devem ser recobertas por algum material inerte, como parafina, como sugerido por Lindow, Arny, e Upper (1978). Revestimentos hidrofóbicos assim também são úteis para prevenir a propagação do gelo de gotas congeladas para gotas líquidas, o que pode ocorrer através de cristais que crescem ao longo da superfície acumulando umidade do ar.

O arranjo de gotas da amostra é testado através da refrigeração, contínua ou em estágios, da superfície em que estão depositadas. Isto pode ser realizado em laboratório por um banho com controle de resfriamento. A cada determinado intervalo de temperatura abaixo de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, é anotado o número de gotas observadas que congelaram de cada diluição de cada amostra, o que pode prosseguir até não sobraem gotas líquidas para serem examinadas. A partir destes dados, pode se calcular a frequência de nucleação do material testado a partir do método de Vali (1971). Esta frequência pode ser expressa como uma concentração, que pode ser em relação ao volume total da amostra testada ou à quantidade conhecida de partículas presentes em suspensão (como células de bactérias, por exemplo). Para microrganismos como *P. syringae*, é importante notar que a concentração máxima de núcleos de gelo ativos mensuráveis a dada temperatura não poderá exceder a concentração de células presentes. Isto é, não se pode detectar mais de um núcleo por célula, visto que elas não são subdivisíveis e não se separariam em mais de uma gota testada.

As concentrações de núcleos de gelo em uma dada temperatura costumam ser expressos como um valor cumulativo. O motivo disto é porque o número de gotas congeladas em um ponto de temperatura é a somatória do número total de gotas congeladas em temperaturas superiores. Desta forma, uma concentração medida a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ inclui também todos os núcleos ativos desde $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A Figura 9 apresenta, como um exemplo, os espectros de atividade de congelamento de algumas bactérias nucleadoras de gelo isoladas do ambiente. Pode-se observar que a frequência de nucleação varia entre as diferentes cepas de diferentes espécies testadas.

Figura 9 - Exemplos de espectros de atividade de nucleação de gelo de algumas bactérias.

Fonte: Adaptado de Joly et al. (2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

A introdução deste trabalho apresentou a relevância ambiental da nucleação de gelo de certas bactérias – *Pseudomonas syringae* em particular. Estes microrganismos podem ser encontrados em suspensão na atmosfera, por onde podem se dispersar. Em nuvens, sua atividade de congelamento tem o potencial de afetar a precipitação de maneira a facilitar o seu retorno ao solo. Antes disto, contudo, devem sobreviver aos fatores deletérios a que ficam sujeitas ao longo de travessias pelas camadas de ar.

Este trabalho buscou caracterizar os efeitos de condições presentes na atmosfera terrestre sobre cepas de *P. syringae*, avaliando tanto a sobrevivência das células, quanto sua atividade de nucleação de gelo após exposição a determinados fatores de estresse ambiental. Especificamente, se estudou a influência da dessecação e de diferentes faixas do ultravioleta sobre estas células. Desta forma, espera-se compreender melhor como estes microrganismos são capazes de se dispersar no ambiente e se sua capacidade de congelamento é mantida, de maneira a promover sua eventual deposição pela precipitação.

3.2 Objetivos específicos

- a) Padronizar metodologia para avaliação quantitativa da atividade de nucleação de gelo de bactérias no modo de imersão: essencial para permitir a medição das possíveis alterações que os tratamentos aplicados possam causar na capacidade de congelamentos das cepas estudadas;
- b) Determinar, por cultivo, a tolerância de cepas de *P. syringae* ao UV-C, UV-B, UV ambiental (UV-A + UV-B), e dessecação em diferentes umidades relativas, em comparação com *E. coli*: experimentos com o intuito de informar a capacidade destes organismos de sobreviverem em suspensão no ar no ambiente, e, por consequência, seu potencial de disseminação efetiva por este meio;
- c) Avaliar efeitos do ultravioleta e da dessecação sobre a atividade de nucleação de gelo de *P. syringae*: verificar se fatores deletérios às células afetam este importante mecanismo que auxilia a sua deposição pela precipitação, e se mesmo células inviáveis ainda podem ter este impacto no ambiente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Culturas

Foram obtidas as seguintes cepas de *Pseudomonas syringae* para os experimentos, ambas da Coleção de Culturas de Fitobactérias IBSBF do Instituto Biológico do Estado de São Paulo:

- a) *P. syringae* pv. *syringae* IBSBF **281**^T (igual a NCPPB 281 e ATCC 19310): Cepa tipo do patovar *syringae*, isolada do lilás (*Syringa vulgaris*) no Reino Unido;
- b) *P. syringae* pv. *garceae* IBSBF **158**: Isolada de folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*) na cidade de Garça, centro-oeste paulista, em 1955 (GONÇALVES; MASSAMBANI, 2011).

Os nomes completos das cepas foram abreviados neste texto apenas para os códigos “281” e “158”, equivalentes aos da coleção de culturas IBSBF. Elas foram escolhidas por já terem sua atividade de nucleação de gelo descrita previamente na literatura (GONÇALVES; MASSAMBANI, 2011).

Para todos os experimentos, as cepas de *P. syringae* foram crescidas em meio mínimo L_{NP} com sorbitol como fonte de carbono a 15 °C. Sua composição é descrita na Tabela 1. Estas condições de cultivo foram utilizadas para garantir máxima expressão do fenótipo de nucleação de gelo, de maneira constante e reprodutível (NEMECEK-MARSHALL; LADUCA; FALL, 1993). As culturas foram crescidas em 1 ml deste meio líquido em tubos de ensaio (com 15 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro), agitados em posição inclinada para manter a aeração. Para os experimentos, os cultivos foram incubados por 3-4 dias até atingirem uma densidade óptica (DO; em 600 nm, por um caminho óptico de 10 mm) de 0,5-0,7, o que equivale a aproximadamente 5×10^8 células por ml. Para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), foram utilizadas placas de meio ágar nutriente (extrato de carne, 3 g/L; peptona, 5 g/L; ágar, 15 g/L) suplementado com 2,5% de glicerol (NAG), e incubadas a 20 °C (LINDOW; ARNY; UPPER, 1978). Outros meios testados para *P. syringae*, mas não utilizados para os experimentos principais, são o meio B de King (KB: proteose peptona, 20 g/L; K₂HPO₄, 1,5 g/L; MgSO₄·6H₂O, 1,5 g/L; glicerol, 15 ml/L; podendo ser solidificado com ágar, 20 g/L) e ágar de soja tríptica (TSA: hidrolisado pancreático de caseína, 17

g/L; hidrolisado papáico de soja, 3 g/L; glicose, 2,5 g/L; NaCl, 5 g/L; K₂HPO₄, 2,5 g/L; ágar, 15 g/L).

Tabela 1 - Composição do meio L_{NP} com sorbitol.

	mM	g/L
MOPS	50	10,463
KCl	25	1,864
NH ₄ Cl	2	0,107
Na ₂ SO ₄	10	1,420
NaCl	10	0,584
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1	0,203
KH ₂ PO ₄	0,1	0,014
CaCl ₂	0,1	0,011
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,01	0,003
Sorbitol	0,4%	
pH	7,2	

Fonte: Nemecek-Marshall, Laduca, e Fall (1993).

Como controle para os experimentos, se utilizou *E. coli* BL21, outra gamaproteobactéria, como *Pseudomonas*, mas que não possui atividade de nucleação de gelo. Esta cepa foi crescida aerobicamente em meio LB líquido (triptona, 10 g/L; extrato de levedura, 5 g/L; NaCl, 10 g/L), e enumerada em placas LB (solidificadas com ágar, 15 g/L), incubada a 37 °C. Os cultivos foram realizados *overnight* até uma DO de aproximadamente 5,0, o que equivale a cerca de 5×10^9 células por ml. Para alguns ensaios, *E. coli* foi crescida em meio L_{NP} *overnight* a 37 °C até uma DO de aproximadamente 0,5, com entre 5×10^8 e 1×10^9 células por ml.

Para os testes no voo de balão de grande altitude, a bactéria radiotolerante *Deinococcus radiodurans* R1 foi crescida em meio TGY líquido (triptona, 10 g/L; glicose, 2 g/L; extrato de levedura, 6 g/L) e enumerada em placas TGY (triptona, 5 g/L; glicose, 1 g/L; extrato de levedura, 3 g/L; ágar, 15 g/L), a 30 °C, segundo Paulino-Lima (2010). *D. radiodurans* foi incubada por 2 dias até atingir sua fase estacionária, com aproximadamente 1×10^9 células por ml desta bactéria. Todas as diluições foram

realizadas em solução salina NaCl 0,9%, preparada com água ultrapura Milli-Q e esterilizada em autoclave.

4.2 Ensaios com radiação ultravioleta

Para os experimentos com radiação UV-C, utilizou-se um sistema com lâmpadas tubulares de mercúrio em baixa pressão Philips TUV-20W. Estas lâmpadas germicidas, do mesmo tipo que é instalado para limpeza de fluxos laminares, possuem emissão em linha com pico em 254 nm. A irradiação com UV-B foi realizada no mesmo sistema, com lâmpadas tubulares de mercúrio LightTech Narrow Band UV-B 20W e Philips TL20W (um par de cada modelo), ambas com principal linha de emissão em 312 nm. Estas lâmpadas de UV-B não produziram quantidades detectáveis de UV-C (medido em 254 nm), nem seu espectro sugere componentes mais energéticos em comprimentos de onda abaixo da banda principal (ver Figura 10).

O simulador solar Oriel Sol-UV-2 com uma lâmpada de xenônio operada a uma potência de 1000 Watts foi utilizado para reproduzir a radiação solar policromática presente no ambiente, chamada aqui de “UV ambiental”. A emissão deste equipamento é nas faixas do UV-B (280–320 nm) e do UV-A (320–400 nm) com o formato espectral – apenas nestas faixas – semelhante ao que incide na superfície da Terra. Instrumentos como este são utilizados para testes de filtros solares na indústria, e para isto cumprem as exigências para a certificação de agências regulatórias internacionais. Possui um filtro passa-banda UG11 que corta, aproximadamente, abaixo de 280 nm e acima de 390 nm. Assim, são eliminados tanto comprimentos de onda do UV-C, quanto parte do espectro visível e do infravermelho (ver Figura 10).

Figura 10 - Comparação dos espectros (em unidades arbitrárias de fluxo): do Sol sobre a superfície da Terra (ASTM G173-03), do Simulador Solar Sol-UV-2, e das lâmpadas de UV-B e UV-C utilizadas neste trabalho, medidos com um espectrômetro Ocean Optics QE65000.

As intensidades absolutas (em W/m^2) das lâmpadas e do simulador solar foram medidas por um radiômetro Vilber Loumart RMX-3W com fotocélulas (sondas) específicas para os comprimentos de onda de 254 nm (CX-254), 312 nm (CX-312), e 365 nm (CX-365). Este equipamento foi utilizado para determinar as fluências durante os experimentos, que são uma medida da exposição à energia radiante recebida por área de superfície, expressas em J/m^2 ou kJ/m^2 .

Para o UV-C e UV-B, as fluências foram acompanhadas em tempo real posicionando-se as fotocélulas junto às amostras. Para o UV ambiental, foi primeiramente medida a intensidade da emissão lâmpada com as sondas (aproximadamente $75,5 \text{ W}/\text{m}^2$ para o UV-A e $48,7 \text{ W}/\text{m}^2$ para o UV-B neste trabalho), e as amostras foram expostas na sequência por determinados intervalos de tempo. As fluências foram então calculadas como o produto das intensidades e de cada tempo de exposição. As faixas espectrais detectadas pelas sondas não são contíguas, por isto não

se pode simplesmente somar seus valores. Portanto, as fluências para cada faixa são apresentadas separadamente nos resultados destes experimentos.

Para os experimentos com ultravioleta, as culturas das cepas de *P. syringae* e de *E. coli* BL21 foram diluídas 100 x em NaCl 0,9% para completar 8 ml em placas de Petri de vidro autoclavadas com diâmetro de 7 cm. Assim, nestes testes, as suspensões de *P. syringae* possuíam cerca de 5×10^6 células por ml, as de *E. coli* crescidas em LB 5×10^7 . As placas destampadas foram posicionadas sobre um agitador orbital Biomixer/SPLabor, e mantidas sob leve agitação durante os experimentos.

Nos ensaios com UV ambiental, testes preliminares mostraram aparentemente um substancial impacto na nucleação de gelo das células durante o período de irradiação. Foi descoberto, contudo, que o aquecimento das amostras durante estes testes, consideravelmente mais longos que os de UV-C e UV-B, era o responsável por este efeito. Considerando-se a sensibilidade dos núcleos de gelo ao calor, se utilizou para o controle da temperatura um bloco de espuma congelada coberto de tecido preto, posicionado entre as placas e o agitador orbital. Assim, estas amostras foram mantidas a cerca de 0 °C durante estes ensaios. Isto foi empregado para *P. syringae* e *E. coli*, e contribuiu também para evitar a evaporação da água das suspensões de células durante as exposições mais duradouras.

Nos experimentos, alíquotas foram retiradas das suspensões em intervalos determinados pela fluência ou tempo desejados, diluídas em NaCl 0,9% e plaqueadas para a medida de viabilidade por UFC. Isto foi realizado pingando-se 3 gotas de 10 µl na superfície do meio solidificado com ágar para cada diluição (MILES; MISRA; IRWIN, 1938). A sobrevivência dos organismos é dada pela fração N/N_0 , sendo “ N_0 ” a concentração inicial de células viáveis, não irradiadas, e “ N ” as células viáveis recuperadas após os pontos dos tratamentos com ultravioleta. Destes valores obtidos em diferentes repetições (triplicatas, no mínimo), calculou-se a média e o desvio padrão das medidas, apresentadas nos gráficos como símbolos com barras de erro.

Experimentos separados foram realizados para medir o impacto do ultravioleta na atividade de nucleação de gelo das amostras irradiadas. Foram utilizadas exposições mais longas do que as testadas para a sobrevivência: 15 e 8 minutos de UV-C e UV-B, respectivamente, para atingir uma fluência de 10000 J/m² (ou 10 kJ/m²) em cada faixa, e 120 minutos de UV ambiental para um total de 545 kJ/m² de UV-A e 348 kJ/m² de UV-

B. A única diferença na irradiação em si nestes experimentos foi para o UV ambiental, onde se utilizaram amostras de 2 ml em placas de Petri de vidro com 3 cm de diâmetro. Isto foi feito para se possibilitar a exposição de 4 amostras ao mesmo tempo sob a área do foco do equipamento.

4.3 Experimentos de dessecação

Volumes de 10 µl das culturas das cepas de *P. syringae*, ou de *E. coli* BL21, foram retirados e depositados na parede interna de microtubos estéreis. Desta forma, testaram-se populações de aproximadamente 5×10^6 células de cada cepa de *P. syringae*, e, devido à maior densidade de suas culturas em meio LB, 5×10^7 de *E. coli*. Estes tubos contendo as gotas para dessecação foram então passados para recipientes lacrados contendo sílica gel ou MgCl_2 umedecido. Respectivamente, estes tratamentos expõem as células a umidades relativas (RH) de menos de 5% e de aproximadamente 33% (WINSTON; BATES, 1960). Estes valores foram confirmados por medidas com um termo-higrômetro portátil com sonda (modelo AK625, Akso). Para os controles mantidos hidratados, as alíquotas de 10 µl das culturas foram utilizadas para completar 1 ml de NaCl 0,9% (diluição de 100 x) em outro conjunto de tubos. As amostras foram mantidas dentro de uma estufa durante 6 dias com temperatura controlada para 19-20 °C. Para alguns experimentos adicionais com a cepa 158, as amostras foram armazenadas no interior de uma geladeira, com uma temperatura de 4 °C, monitorada por um termômetro. Ao fim deste intervalo, as gotas dessecadas foram ressuspensas em 1 ml de NaCl 0,9%, e, assim como os controles hidratados, foram diluídas e plaqueadas para determinação de UFC da mesma maneira que nos ensaios com ultravioleta. A atividade de nucleação de gelo também foi testada para estas amostras, as mesmas em que se quantificou a sobrevivência.

4.4 Ensaios de atividade de nucleação de gelo

Diferentes metodologias, com pequenas diferenças, mas essencialmente equivalentes, foram avaliadas para medição da atividade de nucleação de gelo para este trabalho. Será descrito aqui o procedimento que ao final se mostrou o mais eficaz, utilizados para a maioria dos ensaios.

Para os experimentos, se utilizou uma bandeja de alumínio recoberta por uma fina camada de parafina. Este recobrimento foi realizado a partir de uma solução de 2% de

parafina em xileno, dispensada com um pipetador. O solvente foi removido dentro de uma capela de exaustão, sobre uma chapa quente entre 50 e 70 °C. Após o preparo, esta superfície foi utilizada para se depositar arranjos de gotas de 10 µl das amostras, manuseadas com o auxílio de um pipetador multicanal. Tipicamente, foram testadas 32 gotas para cada diluição. Este preparo foi realizado dentro de uma cabine de fluxo laminar para evitar contaminação de partículas do ar. A bandeja foi então selada com uma placa de acrílico transparente, vedada com um anel de EVA ao longo da sua borda, e mantida presa por prendedores de metal. O sistema montado foi então levado para um banho frio de etanol 96% e posto para flutuar sobre esta solução. Selar a bandeja desta maneira traz vantagens como evitar contaminações, impedir respingos de etanol sobre a superfície, e poder imergi-la por completo no banho para facilitar o equilíbrio de temperatura.

Para controle de temperatura, foi empregado inicialmente um banho ultratermostático da marca Quimis (Q214M3). Eventualmente, se passou a utilizar um banho Neslab LT-50, mais eficiente e com maior capacidade de troca de calor. A temperatura do sistema foi acompanhada por um termômetro de mercúrio (modelo Incoterm 5001, com escala interna de +50 a -30 °C e divisões de 1 °C), imerso no banho.

As gotas foram visualizadas através do acrílico transparente. A temperatura foi reduzida em estágios de 1 °C, mantida por 5 minutos, e após isto o número de gotas congeladas era contado. Com esses valores, e o conhecimento da concentração de células das amostras (determinado por contagem de UFC), pode-se calcular a concentração cumulativa de núcleos de gelo ativos por célula a cada temperatura medida. O método para isto foi descrito inicialmente por Vali (1971), e adaptado para ensaios microbiológicos na forma em que é utilizado até a atualidade:

$$c(T) = [\ln (N_{\text{total}}) - \ln (N_{\text{total}} - N(T))] / A$$

Onde $c(T)$ é o número de núcleos de gelo por célula na temperatura T , N_{total} é o número total de gotas testadas, $N(T)$ é o número de gotas congeladas na temperatura T , e A é o número de células por gota. Dos valores obtidos por este cálculo em diferentes repetições (quadruplicatas, no mínimo), calculou-se a média e o desvio padrão das medidas, apresentadas nos gráficos como símbolos com barras de erro.

Controles com gotas de solução NaCl 0,9% preparada com água ultrapura Milli-Q e esterilizada em autoclave não apresentaram congelamento acima de cerca de -25 °C neste sistema desenvolvido. Com as concentrações de *P. syringae* utilizadas nos experimentos, de no máximo 5×10^6 por ml, o limite de detecção da técnica aplicada tipicamente residia entre 10^{-7} e 10^{-6} núcleos de gelo por célula a cada temperatura. O limite superior, como mencionado na introdução, seria de 1 núcleo por célula, o que não foi atingido em nenhum dos ensaios.

Após cada teste, a superfície da bandeja foi desinfetada e limpa. A parafina foi removida com auxílio de uma espátula e de isopropanol. Antes dos experimentos seguintes, novamente se realizava o recobrimento hidrofóbico. Este procedimento foi utilizado, devido à sensibilidade do teste, para evitar contaminações de uma amostra para outra.

Para os experimentos com ultravioleta e dessecação, decidiu-se tomar como métrica geral da atividade de congelamento apenas a concentração de núcleos de gelo cumulativos por célula a -5 °C. Como visto na introdução deste trabalho, esta temperatura é usada para definir os núcleos biológicos mais eficientes (classificados como “tipo I” por alguns autores), e também está no limite da faixa em que há maior impacto ambiental do congelamento, seja causando geadas na superfície de plantas ou influenciando o processo de Hallett-Mossop na atmosfera. Além disto, já foi demonstrado que tratamentos que afetam esta atividade das células (como calor: RUGGLES; NEMECEK-MARSHALL; FALL, 1993; pH ácido, ou gases poluentes como NO₂ e O₃: ATTARD et al., 2012) agem primeiro e mais fortemente justamente sobre a nucleação em temperaturas mais altas. Assim, estes valores foram considerados os mais relevantes para serem estudados.

Ao longo do tempo em que os experimentos foram realizados, e dependendo provavelmente de pequenas alterações nas condições de cultura e no processamento das amostras, as médias das concentrações de núcleos de gelo cumulativos a -5 °C que as cepas tipicamente apresentavam sofreram algumas variações. No entanto, não foram muito grandes, dentro de uma ordem de grandeza. Ainda assim, isto foi levado em consideração nos resultados, onde a atividade das amostras tratadas é exibida sempre ao lado dos controles dos mesmos ensaios, frações das mesmas suspensões iniciais de células, e comparada apenas com eles.

4.5 Experimentos em voos de balão de grande altitude

No ano de 2016, foram realizados os primeiros voos de uma nova plataforma estratosférica multipropósito, batizada como Garatêa, desenvolvida pelo grupo Zenith da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). Esta plataforma consiste de uma gôndola contendo um sistema para exposição de amostras ao ambiente da alta atmosfera. A gôndola é carregada por um balão meteorológico até uma altitude de cerca de 30 km, o que corresponde aproximadamente à porção central da estratosfera. Nos voos, durante os quais foram coletadas informações ambientais, foram levadas amostras de microrganismos de interesse. Os experimentos apresentados aqui foram realizados em dois lançamentos a partir da cidade de São Carlos - SP, um em 14 de maio, e outro em 19 de dezembro de 2016. Os balões percorreram grandes distâncias durante os voos, em um dos casos atingindo a divisa do estado de São Paulo a mais de 100 km de sua posição inicial.

Para o preparo das amostras, culturas das cepas de *P. syringae* e de *D. radiodurans* foram lavadas 2 x com solução de NaCl 0,9%. *D. radiodurans* foi diluída pela metade, para ficar com concentração de células mais próxima aos demais organismos. Um conjunto de 8 gotas de 10 µl destas suspensões foi depositado na superfície de tiras de PTFE limpas, desinfetadas por UV-C, já aderidas ao porta-amostras do balão por fita adesiva de carbono. O número de células em cada gota foi de cerca de 5×10^6 . As amostras foram então secas lentamente, por 1-2 horas, dentro de uma estufa a 15 °C, com uma RH de cerca de 36%. Após isto, foram guardadas dentro de um recipiente para transporte com sílica gel e com temperatura controlada por blocos de gelo. Horas depois, partes das amostras foram removidas para serem presas ao balão. Um grupo de amostras controle, “Terra”, foi mantido dentro do recipiente com sílica durante todo o experimento.

Após o voo, com permanência na região da estratosfera por cerca de 1 hora, as amostras recuperadas, “Voo Balão”, foram ressuspensas em NaCl 0,9%, diluídas e plaqueadas para enumeração de UFC. Para *P. syringae*, também se testou a nucleação de gelo destas amostras. Devido a forma como foram processadas, todas as 8 amostras de cada cepa foram testadas agrupadas como uma única série de gotas no congelamento, não como repetições individuais. Assim, não se pode determinar uma dispersão mais exata destas medidas, apenas seu valor médio.

D. radiodurans foi escolhida para comparação nestes experimentos por ser um organismo reconhecidamente resistente às condições encontradas na estratosfera, especialmente à dessecação e à radiação ultravioleta, incluindo a faixa do UV-C (BAUERMEISTER et al., 2011). Além disto, membros do gênero *Deinococcus* já foram isolados deste ambiente, ainda que não esta espécie em particular (YANG; YOKOBORI; YAMAGISHI, 2009).

4.6 Experimentos com câmara de simulação ambiental multiparamétrica

Para os experimentos de simulação em laboratório da alta troposfera, foi utilizada a Câmara de Simulação de Ambientes Espaciais e Planetários (AstroCam-1) do Núcleo de Pesquisa em Astrobiologia da Universidade de São Paulo (NAP - Astrobio). Alíquotas de 2 µl das culturas de *P. syringae* foram depositadas sobre fatias de 5 x 5 mm de *wafers* de silício cristalino (Si 111) – escolhido por ser um suporte inerte – previamente limpas e desinfetadas por UV-C. Nestas amostras, portanto, havia um total de 10⁶ células. Estas gotas foram secas sobre sílica gel por 1-2 horas dentro de uma estufa a 15 °C. Após isto, foram presas ao porta-amostras da câmara com fitas adesivas de cobre, próprias para vácuo e com melhor condutividade térmica. A câmara foi inicialmente evacuada com uma bomba mecânica seca para 250 mbar (25000 Pascal), o valor aproximado presente a 10 km de altitude. A atmosfera em seu interior foi ventilada com ar ambiente passado por colunas de sílica gel para remover sua umidade, mantido em equilíbrio nas baixas pressões por ação da bomba de vácuo. Um termo-higrômetro portátil posicionado no interior da câmara confirmou uma RH de menos de 5% nestas condições. Estes valores simulam uma condição de RH especialmente baixa que pode estar presente na alta troposfera.

Após o equilíbrio da pressão, a temperatura das amostras foi reduzida para -40 °C com um criostato refrigerado com hélio líquido, controlado por uma resistência. Este processo levou cerca de 50 minutos. Com a temperatura equilibrada, parte das amostras foi irradiada com um simulador solar Oriel com lâmpada de xenônio operada a uma potência de 1000 Watts. Este simulador é diferente do equipamento utilizado para o UV ambiental, pois tem emissão até 200 nm, incluindo toda a faixa do UV-C e também a luz visível. Parte do infravermelho emitido é absorvido por um filtro de água com um caminho óptico de 10 cm posicionado no percurso da luz, de maneira a evitar o aquecimento excessivo das amostras expostas. Um filtro *Air Mass 1* (AM1) foi utilizado

para tornar o seu espectro mais semelhante ao encontrado na Terra, abaixo da camada de ozônio (ver Figura 11). Assim, com a sonda para UV-C do radiômetro mencionado acima, apenas valores muito reduzidos ($0,01 \text{ W/m}^2$) deste comprimento de onda puderam ser detectados de forma intermitente.

Figura 11 - Espectro do simulador solar com filtro AM1 utilizado nos experimentos com a Câmara de Simulação de Ambientes Espaciais e Planetários.

As amostras foram irradiadas por 15 minutos, com uma intensidade medida no UV-B de 97 W/m^2 , que é a aproximadamente o dobro dos valores utilizados para o UV ambiental. A proporção de UV-A em relação à UV-B foi menor para esta fonte, apresentando uma intensidade de 110 W/m^2 nesta faixa. Parte das amostras com a temperatura controlada foi mantida protegida por um anteparo de alumínio, não recebendo radiação. Após isto, a temperatura do criostato foi retornada até à ambiente e a câmara foi arejada com ar seco. As amostras foram então ressuspensas em NaCl 0,9%, diluídas e plaqueadas para enumeração de UFC da mesma maneira que nos demais ensaios.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Culturas e nucleação de gelo

O cultivo das cepas de *P. syringae* a 20 °C em meio B de King (KB) foi utilizado para evidenciar a produção de pioverdina (SUNDIN; BENDER, 1993). Este pigmento amarelado extracelular, que fluoresce com coloração azulada sob o UV-A, tem função de sideróforo, ou seja, de captar ferro do ambiente (TORRES et al., 1986). A cepa 158 não foi capaz de expressá-lo em KB. De fato, é possível que este patovar não produza sideróforos de qualquer tipo (BULTREYS et al., 2001). Em troca, apenas 158 produziu um pigmento escuro em TSA, também difusível, possivelmente pertencente à classe das melaninas (KAIRU, 1997).

Ensaio com crescimentos nestes meios renderam atividade de nucleação de gelo baixa, e de pouca reprodutibilidade. Avaliou-se realizar os testes a partir de crescimentos em meio KB solidificado com ágar, o que aumentaria a expressão do fenótipo de congelamento (POOLEY; BROWN, 1991). Ainda assim, novamente se observou inconsistências nestes ensaios. Eventualmente, isto pode ser remediado com cultivos em meio mínimo L_{NP} com sorbitol a 15 °C (NEMECEK-MARSHALL; LADUCA; FALL, 1993). Seu uso, apesar de limitar o crescimento das bactérias, garantiu a máxima nucleação de gelo pelas cepas, possibilitando experimentos mais precisos e confiáveis. Neste meio, apenas 281 produziu leve fluorescência sob o UV-A, perceptível apenas em um ambiente escuro.

A Figura 12 apresenta os espectros de atividade de nucleação de gelo das cepas de *P. syringae* estudadas. Nos ensaios cujos dados foram utilizados para montar estas curvas, as frequências de congelamento observadas para as cepas foram relativamente próximas para a maioria das temperaturas testadas, com 281 sendo ligeiramente maior em alguns casos. Esta frequência varia naturalmente entre linhagens de *P. syringae*, mesmo sob condições idênticas de cultivo (GROSS et al., 1983), o que pode também ser observado na Figura 9, com dados de Joly e colaboradores (2013). Outro fator que pode variar é o limite superior de atividade (ATTARD et al., 2012; JOLY et al., 2013), que para 281 foi de -3 °C e para 158 foi de -4°C.

Figura 12 - Espectro da atividade de nucleação de gelo das cepas 281 e 158 de *P. syringae*. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

Ao discutirem a utilidade experimental do meio L_{NP}, Nemecek-Marshall, Laduca, e Fall (1993) comentam que ele provavelmente se assemelha mais às condições de crescimento naturais destas bactérias sobre a folhagem de plantas, com limitação na disponibilidade de nutrientes (nitrogênio e fósforo neste caso em particular). De fato, microrganismos expressam uma proporção maior de núcleos de gelo mais ativos quando crescidos em plantas, quando comparados com cultivos em meios de cultura ricos e complexos (O'BRIEN; LINDOW, 1988). Como fonte de carbono, os principais nutrientes na superfície de plantas são carboidratos como glicose, frutose, e sacarose, e também ácidos orgânicos (DERRIDJ, 1996). A disponibilidade destes substratos, entretanto, é limitada pela dificuldade de difusão destas moléculas ao longo da superfície foliar (MERCIER; LINDOW, 2000). Sorbitol (presente como fonte de carbono em L_{NP}) também é produzido a partir da glicose por plantas e está presente nas folhas, sobretudo em membros da família Rosaceae (BIELESKI, 1982; BIELESKI; REDGWELL, 1985). Este substrato pode ser convertido em frutose pela enzima sorbitol desidrogenase e catabolizado pela mesma via que outros açúcares, Entner-Doudoroff,

característica de *Pseudomonas*. Algumas cepas não expressam esta enzima (pv. *phaseolicola*, por exemplo), mas também não são capazes de crescer com sorbitol como fonte de carbono (RICO; PRESTON, 2008).

Para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e quantificação da viabilidade das células, inicialmente foram testadas placas KB ou TSA. Por fim, decidiu-se por plaqueá-las em meio NAG para todos os ensaios, onde as contagens se mostraram mais confiáveis.

Além das diferenças fisiológicas já mencionadas em relação à produção de pigmentos e à temperatura de congelamento, e como se poderá observar nos resultados dos experimentos de sobrevivência que ainda serão descritos neste trabalho, existem distinções significativas entre as cepas estudadas. Para interpretar isto, é relevante saber que os organismos reconhecidos como *Pseudomonas syringae* são melhor entendidos como um complexo de espécies com grande variabilidade (BERGE et al., 2014). Desta forma, mesmo definidas até então como “*P. syringae*”, estas cepas podem ter diferenças genéticas expressivas, e inclusive podem vir a ser classificadas como outras espécies no futuro, com o avanço da genômica destas bactérias.

5.2 Radiação ultravioleta

Os testes realizados de exposição à radiação UV-C mostraram a sensibilidade das cepas de *P. syringae* a essa faixa do ultravioleta. Ambas apresentaram um perfil de sobrevivência muito semelhante à *E. coli*, um organismo reconhecidamente pouco tolerante ao UV-C (Figura 13). Mais energética que o UV-A e o UV-B que atingem a superfície da Terra, esta faixa de radiação está presente apenas nas partes mais altas da atmosfera, antes de ser completamente absorvida pelo gás oxigênio e pelo ozônio. Vale notar que este ambiente, a estratosfera (aproximadamente entre 10 e 50 km de altitude), é pouco relevante para a formação de nuvens, que se formam mais abaixo na troposfera (até cerca de 10 km). O limite entre as duas, a tropopausa, varia com a latitude, sendo mais alta nos trópicos. Ainda assim, mesmo a estratosfera possuindo condições muito mais extremas, já foi descrita como local de passagem de células suspensas como bioaerossóis, ainda viáveis, isoladas em diversos trabalhos, o que tem implicações para a disseminação de microrganismos pelo globo (SMITH, 2013; YANG; YOKOBORI; YAMAGISHI, 2009).

Figura 13 - Curva de sobrevivência ao UV-C (254 nm) das cepas 281 e 158 de *P. syringae* e de *E. coli* BL21. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

A radiação UV-B é a faixa de radiação solar com maior capacidade de dano que chega a superfície da Terra, ainda que também seja fortemente absorvida pela atmosfera, em especial pela camada de ozônio e pelas nuvens (BJÖRN, 2008). Ambos UV-B e UV-C são capazes de alterar diretamente a molécula de DNA, formando lesões – fotoprodutos – como dímeros de pirimidina, por exemplo, que bloqueiam as funções do material genético. Também podem gerar efeitos indiretos através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) atacando diversos outros componentes celulares, como proteínas e lipídeos, ainda que seus mecanismos de ataque direto ao DNA possam ser mais relevantes para a inativação (KRISKO; RADMAN, 2010; SANTOS et al., 2013). As cepas de *Pseudomonas* também mostraram pouca resistência ao UV-B (Figura 14). A cepa 158 apresentou uma curva de sobrevivência pouco superior a de *E. coli* BL21, que praticamente se igualou a 281. Para comparação, mesmo nas doses mais altas apresentadas nos gráficos de UV-C ou UV-B, a bactéria radiotolerante *Deinococcus radiodurans* não sofreria nenhuma perda de viabilidade detectável em experimentos de metodologias semelhantes (PULSCHEN et al., 2015).

Figura 14 - Curva de sobrevivência ao UV-B (312 nm) das cepas 281 e 158 de *P. syringae* e de *E. coli* BL21. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

Uma métrica comumente utilizada para comparar a resistência de microrganismos às radiações é o valor da dose (D_{10} , para radiação ionizante) ou fluência (F_{10} , para ultravioleta) que deixa apenas 10% da população sobrevivente. Isto é, a energia que inativa 90% das células iniciais. Os experimentos com UV-C e UV-B são sumarizados na Tabela 2 com base nas F_{10} estimadas pelas curvas de sobrevivência obtidas. A tabela também inclui para comparação dados obtidos em condições idênticas de *D. radiodurans* (PULSCHEN et al., 2015).

Tabela 2 - F_{10} estimadas a partir das curvas de sobrevivência ao UV-C e UV-B.

	UV-C	UV-B
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 281	30 J/m²	800 J/m²
<i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> 158	50 J/m²	1400 J/m²
<i>E. coli</i> BL21	30 J/m²	800 J/m²
<i>D. radiodurans</i> R1*	1000 J/m²	> 120000 J/m²

*Fonte: Pulschen et al. (2015).

Danos ao DNA podem ser remediados por diferentes mecanismos em *Pseudomonas*. O sistema de fotoreparo é conferido pela enzima fotoliase, que, ativada por luz entre o ultravioleta próximo e o azul, repara dímeros de pirimidina. Reparo independente de luz é realizado pelo sistema de excisão de nucleotídeos (NER) que remove fotoprodutos das sequências e os corrige (GUNASEKERA; SUNDIN, 2006; KIM; SUNDIN, 2001). A espécie *P. syringae* dispõe no DNA plasmidial do operon de reparo mutagênico de DNA induzido por UV-B *ruLAB*. Foi mostrado que sua expressão confere aumento da resistência a esta faixa de radiação, mas também aumenta a mutabilidade das cepas. *E. coli* possui sistema homólogo de função semelhante, o operon *umuDC* localizado no DNA cromossomal (KIM; SUNDIN, 2000). Entretanto, a presença destes genes em *P. syringae* varia muito dentro da espécie, mesmo dentro dos patovares de diferentes hospedeiros (SUNDIN; MURILLO, 1999). Park e colaboradores (2014) não encontraram sequências putativas de plasmídeos ao sequenciar o genoma da cepa 281 estudada neste trabalho. Quanto à cepa 158, não se possui este dado.

Na literatura, em experimentos de exposição direta a luz natural do Sol, o fator sigma alternativo RpoS se mostrou importante para a sobrevivência de *P. syringae* pv. *syringae*. Genes regulados por esta proteína já foram bem caracterizados em *E. coli* como ligados à resposta ao estresse oxidativo, como reparo de DNA e sequestro de ROS por antioxidantes. Em estudos com mutantes, sua deleção causou aumento de sensibilidade de *Pseudomonas* ao UV, possivelmente decorrente da não ativação de genes com estas funções protetoras (MILLER et al., 2001).

Chavarría e colaboradores (2013) propuseram que o metabolismo catabólico de carboidratos pela via de Entner-Doudoroff de *Pseudomonas* protege estas células por sua eficiência em gerar poder redutor na forma do cofator NADPH, maior do que através da via glicolítica. O principal efeito deste cofator, neste sentido, é atuar na redução de glutatona oxidada. A glutatona, em sua forma reduzida, tem importante função na defesa da célula a diferentes estresses, em particular ao estresse oxidativo (MASIP; VEERAVALLI; GEORGIU, 2006). Olavarria e colaboradores (2015), porém, mostram que ao menos em *Pseudomonas putida* as quantidades de NADPH geradas efetivamente são menores que NADH, cujo papel no controle de ROS não é tão bem definido.

D. radiodurans dispõe de carotenoides como mecanismo de resistência passiva ao UV, que funcionam como antioxidantes protegendo outros componentes celulares (SLADE; RADMAN, 2011). *P. syringae* não possui estes pigmentos, mas pode-se especular que a pioverdina, produzida por 281, e o tipo de melanina de 158, poderiam contribuir para a sobrevivência de maneira semelhante, ou até servindo como filtros solares por absorção direta da radiação. Visto que em laboratório apenas certas condições de cultivo propiciam o acúmulo destes metabólitos, não se pode concluir que cumpririam também este papel de forma significativa no ambiente. Mesmo em seu habitat natural, nas folhas de plantas, já foi contestado se a pioverdina é produzida em quantidades significantes (LOPER; LINDOW, 1987).

Ensaio preliminares mostraram que fluências de UV-C e UV-B capazes de inativar populações de *P. syringae* em várias ordens de grandeza, ou, efetivamente, por completo, não induziam nenhum efeito perceptível em suas atividades de nucleação de gelo. Portanto, se decidiu utilizar uma fluência arbitrariamente grande (10000 J/m² para ambas estas faixas do ultravioleta) na tentativa de se distinguir algum impacto da radiação.

O tratamento com altas fluências de UV-C, para 281, não causou nenhum efeito no congelamento das células a -5 °C, apesar de a dispersão das medidas ter se reduzido em relação aos controles (Figura 15). Para a cepa 158, entretanto, se observou uma redução significativa da atividade nesta temperatura, em cerca de 10 x. É importante notar que, apesar disto, cerca de uma a cada mil células na suspensão ainda manteve a capacidade de congelamento nesta temperatura. Anderson e Ashworth (1986) expuseram uma cepa de *Pseudomonas* nucleadora de gelo a uma fluência de 40500 J/m² de UV-C (254 nm), o que acarretou uma queda imediata de quase 3 °C na temperatura de máxima de congelamento de suspensões destas células. Estes autores utilizaram apenas uma metodologia qualitativa para medir a atividade de nucleação, o que dificulta comparações com os resultados obtidos. Turner, Arellano, e Kozloff (1991) observaram que UV-C inativava *P. syringae* por completo, mas sem afetar a nucleação. Contudo, não informaram a fluência utilizada para isto.

Figura 15 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras das cepas 281 e 158 de *P. syringae* expostas ao UV-C. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

Para o UV-B, não foram observadas alterações na atividade a -5 °C tanto de 281, quanto de 158 após a irradiação (Figura 16). Ambas as cepas permaneceram nos mesmos patamares de concentração cumulativa de núcleos de gelo que os controles não expostos. Pode-se perceber que esta concentração inicial medida de núcleos de gelo por célula foi ligeiramente diferente nestes testes com UV-B do que nos demais experimentos apresentados, o que pode se dever a pequenas variações de caráter biológico ou experimental. Isto não deve impactar a significância dos resultados obtidos, visto que foram avaliadas apenas as mesmas amostras antes e depois da irradiação nas mesmas placas.

Figura 16 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras das cepas 281 e 158 de *P. syringae* expostas ao UV-B. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

A radiação UV-C poderia causar danos às proteínas de nucleação de gelo de maneira indireta, através da produção ROS. Apesar disto, Santos e colaboradores (2013) mediram para o UV-C uma taxa de geração de ROS intracelular em bactérias inferior ao UV-B e ao UV-A. O mecanismo de inativação desta faixa de radiação foi sobretudo relacionado diretamente ao ataque a molécula de DNA, segundo estes autores. Visto que o UV-B não afetou o congelamento, a redução da atividade em 158 sob o UV-C pode se dever a outros fatores além de ROS nestas condições.

Danos diretos do UV-C poderiam ocorrer em aminoácidos fotodanificáveis na estrutura da proteína de nucleação de gelo. Com base na sequência de InaZ, disponível no banco de dados online UniProt, se analisou a presença destes componentes possivelmente mais sensíveis ao ultravioleta, da maneira proposta por Farci e colaboradores (2016). Utilizando o software ProtParam da plataforma ExPASy (GASTEIGER et al., 2003; disponível em <<http://web.expasy.org/protparam/>>),

calculou-se as proporções de resíduos de tirosina, histidina, cisteína, e triptofano da sequência total da proteína (1200 aminoácidos), e apenas da sua região central (976 aminoácidos) que apresenta uma periodicidade imperfeita repetitiva, e que compõe a sua interface que ativamente interage com a água (WOLBER; WARREN, 1989). Somados, os resíduos de histidina, cisteína, e triptofano não chegam a 2% do total do peptídeo e a 1% da região central. A tirosina pode ser considerada o resíduo mais importante neste caso, chegando a 6,5% do domínio central. Este aminoácido é um componente das repetições periódicas de 8 resíduos consenso que compõem a estrutura deste domínio (Ala-Gly-**Tyr**-Gly-Ser-Thr-Leu-Thr). O ultravioleta pode causar diferentes danos sobre a tirosina, formando produtos oxidados (através de reações de carbonilação, por exemplo) ou criando ligações cruzadas como pontes ditirosina com outras proteínas (GIULIVI et al., 2003). Isto pode ser importante segundo o modelo da estrutura da proteína de nucleação de gelo proposto por Garnham e colaboradores (2011), comentado anteriormente. Nele, os resíduos de tirosina formam uma escada lateral ao longo da beta-hélice formada pelo domínio central da sequência. Esta porção da estrutura seria responsável por promover a agregação destas proteínas por interações hidrofóbicas, o que é necessário para a atividade de nucleação em temperaturas mais altas.

Para uma simulação mais condizente com a baixa atmosfera ou a superfície terrestre, foi utilizado um simulador solar com emissão em espectro contínuo, policromático, com UV-A e UV-B em proporções semelhantes às encontradas no ambiente. Estes experimentos, mais longos do que os com UV-C e UV-B, foram realizados com as células sobre um bloco de espuma congelada para controlar a sua temperatura. Por isto, é importante notar que próximo de 0 °C as cinéticas das reações com ROS são mais lentas, tornando-as menos efetivas. Assim, os efeitos indiretos do UV podem ser parcialmente reduzidos, mas comparações ainda podem ser estabelecidas diretamente com *E. coli*, que foi irradiada nas mesmas condições.

Figura 17 - Curva de sobrevivência ao UV ambiental (UV-A + UV-B) das cepas 281 e 158 de *P. syringae*, e de *E. coli* BL21 crescida em meio LB e em meio L_{NP}. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

Sob o UV ambiental, em temperaturas próximas de 0 °C, as cepas de *P. syringae* apresentaram resistência superior à de *E. coli* BL21. Mesmo após 1 hora de irradiação, não perderam mais de 90% de viabilidade (Figura 17). Visto estas diferenças significativas de sobrevivência nestes experimentos, testou-se também a resistência de células de *E. coli* crescidas em meio L_{NP}, para se poder descartar a tolerância superior das cepas de *P. syringae* como um artefato das suas condições de cultivo. Como pode ser observado na, nestas condições a sobrevivência de *E. coli* foi ainda menor do que quando cultivada em meio LB.

Joly e colaboradores (2015) expuseram dois isolados de *P. syringae* coletados de nuvens à aproximadamente 85,7 kJ/m² de UV-A e 27 kJ/m² de UV-B ao longo de 10 horas em uma temperatura de 5 °C. Após este período, os isolados sofreram virtualmente nenhuma perda de viabilidade, o que está de acordo com os resultados apresentados na Figura 17, onde as cepas de *P. syringae* toleraram fluências muito

maiores do que as utilizadas neste estudo anterior. Apesar disto, estes autores utilizaram uma lâmpada fluorescente com espectro muito diferente do utilizado neste trabalho, incluindo luz visível e uma fração de UV-C.

Para uma comparação com o mesmo tipo de simulador solar, Pulschen e colaboradores (2015) relataram a sensibilidade de *D. radiodurans* sob o UV ambiental. Em condições semelhantes (mas a temperatura ambiente), expostas a fluências próximas às do ponto de 30 minutos da Figura 17, mais de 90% das células desta bactéria já teriam sido inativadas. Apesar de ser um extremófilo reconhecidamente radiotolerante, *D. radiodurans* é particularmente sensível a um tipo de ROS gerado por reações de fotossensibilização com o UV-A, chamado de oxigênio singleto (SLADE; RADMAN, 2011). Assim, esta bactéria não é bom um modelo de resistência a esta faixa específica do UV.

As intensidades de UV-B utilizadas nestes experimentos, 48,7 W/m², equivalem a 5,2 x os valores em São Paulo (9,3 W/m²), e 3,1 x os valores a 5 km de altura na região do Atacama (15,6 W/m²), medidos todos com as mesmas sondas do radiômetro Vilber Loumart RMX-3W em condições de céu limpo, com o Sol no zênite e no verão (PULSCHEN et al., 2015). A intensidade desta faixa da radiação solar escalona mais rápido com a altitude do que o UV-A, tornando-se também mais biologicamente significativa. É importante esclarecer que devido às diferenças entre o espectro em linha das lâmpadas de UV-B e da emissão contínua do simulador solar (Figura 10), a resposta biológica à estas fontes não é exatamente equivalente. Por isto, as curvas de sobrevivência ao UV-B e ao UV ambiental não podem ser diretamente comparadas (PULSCHEN et al., 2015).

A possibilidade de fotorreparo ocorrer nas células durante a irradiação pode ser considerada, dado a duração mais longa destes experimentos e a presença de UV-A, requerido para a atividade da enzima fotoliase. Suspensas em solução salina NaCl 0,9%, as células não têm nutrientes disponíveis para mecanismos de reparo de alta demanda energética, como o reparo por excisão de nucleotídeos. Entretanto, o processo eficiente ativado por luz das fotolases não sofre esta limitação, podendo ser significativo nestas condições anteriores ao plaqueamento em meio de cultura (MEADOR et al., 2014). As baixas temperaturas podem também inibir o metabolismo das células e outros processos de resistência dependentes de enzimas. *P. syringae*, contudo, é capaz de crescer e se

manter ativa próximo de 0 °C (YOUNG; LUKETINA; MARSHALL, 1977), enquanto *E. coli*, menos tolerante ao frio, poderia ser desfavorecida nesta situação.

A atividade de nucleação de gelo foi medida para amostras expostas ao UV ambiental, nas mesmas intensidades utilizadas nos ensaios de sobrevivência, mas por uma duração de 2 horas (Figura 18). Isto totalizou fluências de 545 kJ/m² para o UV-A e 348 kJ/m² para o UV-B. Como no caso do UV-C, não houve diferença significativa para 281 quando irradiada, enquanto 158 apresentou uma queda de 10 a 100 x na atividade a -5 °C.

Figura 18 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras das cepas 281 e 158 de *P. syringae* expostas ao UV ambiental (UV-A + UV-B). As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

Attard e colaboradores (2012) realizaram experimentos com uma fonte de luz semelhante, mas com o UV-B atenuado por um filtro. Estes autores observaram apenas um efeito muito pequeno na atividade de congelamento a -5 °C de cepas de *P. syringae* expostas por 42 horas a uma intensidade de 33 W/m² de UV-A. Visto que estas fluências altíssimas não afetaram a nucleação, no caso de 158 a perda poderia estar mais

relacionada à faixa do UV-B. Entretanto, os resultados com a lâmpada com emissão em 312 nm, em que não houve perda de atividade, não corroboram esta suposição. Deve-se novamente recordar, contudo, que o espectro desta fonte é muito diferente de um simulador solar. Resta ainda a possibilidade de que efeitos sinérgicos entre o UV-B e o UV-A acarretaram o que foi observado.

5.3 Dessecação

As amostras de bactérias dessecadas foram armazenadas a 19-20 °C sob baixa umidade relativa (RH), juntamente com os controles. A estabilidade de temperatura serviu para garantir a estabilidade de RH, que é um fator dependente dela. Após 6 dias nestas condições, a perda de viabilidade das cepas variou entre as RH utilizadas (Figura 19).

Figura 19 - Sobrevivência (N/N_0) dos controles mantidos hidratados em solução e das amostras dessecadas sob RH 33% e <5%. Foram testadas as cepas 281 e 158 de *P. syringae*, e *E. coli* BL21 crescida tanto em meio LB e em meio L_{NP} . As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

Para os controles mantidos hidratados em NaCl 0,9%, a aproximadamente 20 °C por 6 dias e no escuro, as concentrações de UFC foram semelhantes aos valores antes do

tratamentos. Ou seja, nestas condições de temperatura, sem os nutrientes de um meio de cultura, não houve perda substancial de viabilidade (Figura 19).

A cepa 281 se mostrou relativamente sensível à dessecação nas duas RH testadas. Nos dois tratamentos, *E. coli* BL21 crescida em LB manteve uma viabilidade de 3 a 4%, enquanto suas amostras crescidas em L_{NP} foram quase 1000 x mais sensíveis. A cepa 158 apresentou tolerância semelhante a *E. coli* BL21 cultivada em LB sob RH 33%, e superior sob RH <5%, onde $22 \pm 8\%$ de sua população inicial sobreviveu (Figura 19). Para comparação, células de *D. radiodurans* permanecem com cerca de 25% e 15% de viabilidade sob RH ~4% e 33%, respectivamente, por 28 dias (BAUERMEISTER et al., 2011).

A RH, como fator climático, varia amplamente em escala local e global. Médias máximas são predominantes na zona equatorial, e mínimas em cinturões secos subtropicais (PEIXOTO; OORT, 1996). Este fator também varia com a altitude (em especial a umidade absoluta, diretamente dependente a pressão), tendendo a decrescer. Ao se atingir a estratosfera, o ar presente é quase completamente seco (MANABE; WETHERALD, 1967). A RH do ar é determinante para a disponibilidade de água para microrganismos em ambientes expostos, como superfícies vegetais. Somando-se a ela, há o potencial osmótico dos solutos presentes, e o potencial mátrico da tensão superficial da matriz em que as células estão depositadas. Estes fatores em conjunto reduzem a capacidade de organismos obterem água, e podem levar, em ordem de severidade, a redução de sua atividade metabólica (dormência), danos celulares, e até sua inativação.

O potencial de água ao qual as células foram expostas nestes experimentos está bem abaixo dos limites estabelecidos para a multiplicação de todos os domínios da vida conhecida, incluindo diferentes tipos de extremófilos (STEVENSON et al., 2015). Assim, pode-se descartar a possibilidade de *P. syringae* ter sido capaz de metabolizar nestas condições de baixa umidade a ponto de conseguir realizar divisão celular, o que poderia deslocar as medidas de viabilidade.

Em ambientes naturais, organismos como *P. syringae* estão transientemente expostos a estas baixas RH. Durante estes períodos, devem possuir adaptações que permitam resistência passiva a estas condições e previnam danos celulares. Por exemplo, o estresse dessecativo induz a produção do exopolissacarídeo alginato em

Pseudomonas (SINGH; KOEHLER; FETT, 1992), o que contribui para sua sobrevivência e adaptação ao ambiente foliar (YU et al., 1999). Em um trabalho de Singh, Koehler, e Fett (1992), sorbitol foi utilizado como soluto para induzir estresse osmótico e síntese de alginato nas cepas testadas, que não eram capazes de metabolizar este composto. As concentrações utilizadas (800 mM) foram muito mais altas que as presentes no meio L_{NP} (22 mM), onde ainda é consumido durante o crescimento. Assim, considera-se que as condições de cultivo não necessariamente poderiam ter pré-condicionado as cepas 281 e 158 aos experimentos de dessecação, ao menos desta maneira.

Após a reidratação, entram em atividade mecanismos ativos de resistência, como os sistemas de reparo mencionados na discussão sobre o ultravioleta. Danos semelhantes aos dois tratamentos ocorrem, pois ROS também tem papel na morte celular por dessecação. Com a perda de água, a concentração destas espécies químicas aumenta através do descontrole da cadeia de transporte de elétrons e a incapacidade de se gerar uma resposta de sistemas antioxidantes nas células entrando em dormência (FREDRICKSON et al., 2008). Lesões na molécula de DNA, incluindo quebras da dupla fita, também ocorrem e se acumulam nestas condições (MATTIMORE; BATTISTA, 1996).

Até este ponto, foram comentados os danos que certos fatores ambientais podem causar especificamente no material genético e nas proteínas das células, através de mecanismos como ROS. Para a dessecação, as estruturas celulares que podem ser mais afetadas são as membranas. Como é na membrana externa das células que se localiza a proteína de nucleação de gelo, pode-se supor que exista um maior potencial de dano a esta atividade nesta situação. Apesar disto, foram descritos na literatura ensaios realizados com o antibiótico que permeabiliza a membrana externa polimixina B (MAKI et al., 1974), e com EDTA, que causa a perda de lipopolissacarídeos que compõem esta camada (GOVINDARAJAN; LINDOW, 1988a), que não afetaram significativamente a atividade nucleadora de *P. syringae*. Além disto, células com este tipo de dano na membrana externa não necessariamente são inativadas, mas ficam mais sensíveis a outros fatores de estresse perdendo esta camada de proteção (ALAKOMI, 2007).

Figura 20 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5°C de amostras das cepas 281 e 158 de *P. syringae* mantidas hidratadas, ou expostas a RH 33% ou <5%. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

A atividade de nucleação de gelo de 281 sofreu impactos semelhantes sob RH de 33% e <5%, com uma queda de 10 a quase 100 x. Para 158, inesperadamente, os controles mantidos hidratados em NaCl 0,9% tenderam a ser os com menor atividade (Figura 20). Enquanto esta cepa apresenta tipicamente uma concentração cumulativa de cerca de 10^{-2} núcleos ativos por célula a -5°C (1 núcleo a cada 100 células), neste experimento apresentaram um valor entre 10^{-5} e 10^{-6} , se aproximando do limite de detecção da técnica. Uma possível explicação para isto é a temperatura de 20°C não ser a ideal para manutenção dos núcleos de gelo de 158. O fato das amostras dessecadas apresentarem atividade relativamente maior sugere que não se trata exatamente de uma resposta metabólica, visto que estas células estavam desidratadas, basicamente em estado de dormência. Uma suposição possível é de que a cepa 158 produz lipídios de membrana mais fluidos, o que é um fator que se sabe reduzir a estabilidade dos núcleos de gelo (LINDOW, 1995). Assim, o mecanismo da perda da atividade poderia ser puramente físico, com o processo de desagregação das proteínas que formam os núcleos sendo mais lento nas células dessecadas. É interessante notar também que uma maior

fluidez de membrana também pode estar associada a uma maior resistência de células à dessecação (POTTS, 1994), como 158 apresentou nos ensaios de sobrevivência anteriores (Figura 19).

Figura 21 - Sobrevivência (N/N_0) dos controles mantidos hidratados em solução e das amostras dessecadas sob RH 33% e <5%. A cepa 158 de *P. syringae*, foi testada mantida a 20 °C (mesmos dados que a Figura 19) ou a 4 °C. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

Testes subsequentes foram realizados para avaliar se a manutenção das células de 158 em temperaturas mais baixas (4 °C) poderia estabilizar os seus núcleos de gelo ao longo da duração dos experimentos (6 dias). Primeiramente, a sobrevivência destas células, que já eram razoavelmente resistentes à dessecação, foi muito semelhante nestas condições (Figura 21). A atividade de congelamento ao final foi, contudo, mais de 10 x maior para os controles e para RH 33%, quando comparado aos ensaios a 20 °C (Figura 22). Apenas as amostras de RH <5% não apresentaram nenhuma diferença. Conclui-se que, de fato, a temperatura de 20 °C pode ter favorecido uma maior degradação da atividade de nucleação de gelo. Visto que a recuperação não foi completa, outros fatores também devem propiciar a este decaimento espontâneo na capacidade de congelamento em células que não estão ativamente crescendo, hidratadas ou dessecadas.

Figura 22 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras da cepa 158 de *P. syringae* mantidas hidratadas, ou expostas a RH 33% ou <5%, a 20 °C (mesmos dados que a Figura 20) ou a 4 °C. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

5.4 Balão estratosférico

Em dois voos do balão de grande altitude, apenas foi possível recuperar as amostras enviadas junto com a sonda, mas mantidas protegidas da luz solar por um anteparo. O subconjunto de amostras expostas ao Sol (visíveis na Figura 23, que mostra o balão no estágio mais alto do primeiro voo) foi perdido nas duas ocasiões após a descida até o solo. Assim, os dados apresentados são uma comparação de amostras controle dessecadas em laboratório, identificadas com “Terra”, e amostras expostas a todos os fatores do ambiente estratosférico, exceto o ultravioleta, identificadas como “Voo Balão”. Estas condições foram medidas por um conjunto de sensores instalados na gôndola do balão.

Figura 23 - Fotografia capturada na estratosfera durante a ascensão do primeiro voo do balão.

Pelos dados coletados durante o segundo voo do balão, observou-se que as amostras de células foram expostas a pressões mais de 100 x vezes menores que no solo (que é de cerca de 930 mbar, ou 93000 Pascal, na cidade de São Paulo), temperaturas abaixo de -25 °C, e uma umidade relativa extremamente baixa (inferior ao limite de detecção do sensor equipado na sonda). Apesar destas condições extremas, células viáveis de *P. syringae* puderam ser recuperadas após retornarem da estratosfera, assim como *D. radiodurans*.

Como tendência geral, semelhante ao que se observou nos ensaios de dessecação, a cepa 281 foi mais sensível do que 158 nestes experimentos, mas as proporções variaram significativamente entre os voos. No primeiro voo (I), após as cepas terem sido dessecadas, a exposição à estratosfera (protegidas da radiação solar) só aparenta ter causado danos adicionais em 281, que apresentou uma sobrevivência aproximadamente 4x menor do que em terra. Entretanto, para o segundo voo (II) foram observados efeitos diferentes. Para 281, “Terra” apresentou uma sobrevivência maior, enquanto “Voo Balão” perdeu mais viabilidade, tanto total quanto em relação aos controles. Para 158, houve menor sobrevivência tanto para “Terra” quanto para “Voo Balão”. *D. radiodurans* foi mais resistente que ambas as cepas de *P. syringae* em todas as situações nos dois voos (Figura 24). Estas variações podem se dever a diversos fatores, incluindo a época do ano durante os lançamentos (o primeiro em maio, no outono, e o segundo em dezembro, no final da primavera), condições climáticas locais, a duração do voo da

sonda (que foi cerca de 2 horas), o tempo que levou para recuperá-la, condições após a queda, e o tempo até as amostras serem processadas (que foi mais longo para o segundo voo, aproximadamente 1 dia). Assim, os dois voos não foram tratamentos completamente equivalentes.

Figura 24 - Sobrevivência das cepas 281 e 158 de *P. syringae* e *D. radiodurans* expostas ao ambiente estratosférico. “Terra” é o controle mantido dessecado que não voou no balão. “I” e “II” se referem aos dois voos realizados, considerados como experimentos a parte. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

Para o primeiro voo do balão (I), a atividade de nucleação de gelo das cepas não parece ter sido afetada de maneira muito significativa. Para 281, a atividade apresentada pelas amostras que retornaram da estratosfera foi até ligeiramente maior. Por outro lado, no segundo voo (II), se observou uma tendência mais clara de diminuição da atividade de congelamento nas amostras que voaram (Figura 25). É importante mencionar que os controles mantidos em Terra, por terem também sido dessecados, já apresentam atividade inferior à das culturas, caracterizadas nos experimentos descritos anteriormente.

Figura 25 - Concentração cumulativa de núcleos de gelo por célula ativos a -5 °C de amostras das cepas 281 e 158 de *P. syringae* mantidas dessecadas em terra, e de amostras que foram expostas a estratosfera em dois voos de balão (I e II).

5.5 Câmara de simulação

A maioria dos experimentos realizados no laboratório neste trabalho utilizou estresses (parâmetros) individuais sobre as células. No ambiente, contudo, vários fatores diferentes atuam sobre os microrganismos. Por isto, foram realizados ensaios de exposição das cepas de *P. syringae* em uma câmara para simulações multiparamétricas das condições encontradas na atmosfera (Figura 26). Escolheu-se uma altitude de cerca de 10 km, próxima à tropopausa, onde estão presentes as menores temperaturas da baixa atmosfera.

Figura 26 - Foto da câmara de simulação sendo operada com o simulador solar ligado.

Parte das amostras destes experimentos com a câmara não foram irradiadas, apenas dessecadas sob baixa pressão (250 mbar, ou 25000 Pascal, aproximadamente $\frac{1}{4}$ da pressão ao nível do mar) e refrigeradas até $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas células apresentaram um padrão de sobrevivência semelhante aos ensaios de dessecação e das amostras do primeiro voo do balão, mas com uma diferença mais estreita entre as cepas (Figura 27). Ainda assim, 158 resistiu mais de 10 x mais que 281 (mantendo $6,7 \pm 3,4\%$ de viabilidade, contra $0,3 \pm 0,2\%$).

Figura 27 - Sobrevivência das cepas 281 e 158 de *P. syringae* à simulação multiparamétrica do ambiente em uma altitude de cerca de 10 km, sem radiação solar. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

Para as amostras irradiadas por 15 minutos com o simulador solar com filtro AM1, nenhuma UFC pode ser recuperada de maneira reprodutível. Isto foi inesperado, pois fluências semelhantes do UV ambiental (30 minutos naqueles experimentos) inativaram apenas uma pequena proporção das células. A concentração de células viáveis antes da irradiação, apenas dessecadas, já era significativamente menor (em especial para 281), o que também dificultaria a recuperação de uma proporção reduzida de sobreviventes após a exposição ao UV como fator de estresse adicional. Pode-se calcular que, para reduzir as populações de células para abaixo do limite de detecção de UFC com as diluições utilizadas, o ultravioleta deve ter inativado 281 em mais de 20 x e 158 em quase 1000 x. Também pode ser cogitado que a dessecação de alguma maneira sensibilizaria os organismos ao UV. Por um lado, um teor menor de água intracelular poderia contribuir para a sobrevivência, pois dificultaria a formação de ROS, que também agiriam de maneira menos efetiva a -40 °C. Por outro, mecanismos ativos de resistência, dependentes da atividade metabólica das células, não poderiam entrar em ação enquanto estivessem desidratadas, em dormência, apenas após serem ressuspensas em solução salina e plaqueadas.

6 CONCLUSÕES

Os objetivos propostos para este trabalho puderam ser atingidos de maneira satisfatória. A seguir, são desenvolvidos na ordem em que foram expostos inicialmente, e conclusões adicionais deste estudo são apresentadas na sequência:

- a) Foi implementada e padronizada uma metodologia para a avaliação quantitativa da concentração de núcleos de gelo para as amostras, baseada em sistemas descritos na literatura. Isto permitiu a caracterização do espectro de atividade de congelamento das cepas de *P. syringae* 281 (pv. *syringae*) e 158 (pv. *garcae*), que apresentaram diferenças entre si. Tipicamente, foram detectados entre 10^{-2} e 10^{-1} núcleos de gelo ativos a -5°C por célula destes organismos, quando crescidos em um meio mínimo que induz esta atividade;
- b) Nos testes de sobrevivência, primeiramente, se determinou que as cepas de *P. syringae* são sensíveis à radiação UV-C e UV-B de lâmpadas com emissão monocromática em 254 e 312 nm, respectivamente. Neste critério, se assemelharam à *E. coli*, com uma tolerância muito inferior ao extremófilo *D. radiodurans*, cuja F_{10} é cerca de 20 x maior para o UV-C e 100 x maior para o UV-B (com base em dados disponíveis na literatura: PULSCHEN et al., 2015). Com o uso de um simulador reproduzindo mais fielmente o espectro do Sol no ultravioleta (com apenas UV-A e UV-B, chamado de “UV ambiental”), as cepas de *P. syringae* se mostraram substancialmente mais resistentes. Menos de 90% das suas células foram inativadas após 60 minutos sob este simulador solar, o que pode equivaler a horas de exposição direta no ambiente real. A resposta das cepas à dessecação foi contrastante, com 158, no geral, se mostrando muito mais resistente do que 281. Notavelmente, 158 manteve $22 \pm 8\%$ de sua viabilidade sob uma RH abaixo de 5% por 6 dias, enquanto 281 foi inativada em mais de 99,9%. Estes resultados mostraram que bactérias da espécie *P. syringae* são, até certo ponto, capazes de lidar com estresses presentes no ambiente atmosférico;
- c) A atividade de congelamento da cepa 281 não foi afetada de maneira significativa por nenhuma das faixas do ultravioleta testadas, mesmo em fluências capazes de inativar por completo estas células. Em 158, por outro lado, esta atividade foi reduzida de 10 a 100 X pelos tratamentos com UV-C e UV ambiental. Esta cepa também sofreu forte perda de núcleos de gelo nos experimentos de dessecação, em

um processo que pode estar mais relacionado à temperatura em que as células foram armazenadas do que à desidratação em si. Pode-se concluir que a dessecação causa danos mais diretos à nucleação de gelo do que o ultravioleta, mas ainda assim nenhum destes fatores foi capaz de abolir por completo esta atividade. Desta forma, células de *P. syringae* expostas a estes estresses quando aerossolizadas podem ainda manter parte da sua capacidade de nucleação de gelo em temperaturas significativamente altas (-5 °C), o que pode contribuir para a sua deposição junto à precipitação da maneira apresentada na seção introdutória deste trabalho.

Como mencionado na introdução, células de bactérias podem permanecer por dias em suspensão na atmosfera (BURROWS et al., 2009). Nestas condições, a dessecação e o ultravioleta podem ser os principais fatores deletérios que células de *P. syringae* encontrariam. Observou-se que a resposta à dessecação pode variar entre as cepas, mas ao menos algumas linhagens desta espécie são tolerantes a isto. Para as demais, sua capacidade de serem ativadas como núcleos de condensação (como se sabe que bactérias podem agir) amenizaria este estresse com o acúmulo de água do ar. Assim, o ultravioleta potencialmente é o maior limitante para estas células, apesar de sua menor efetividade biológica na baixa atmosfera (quando comparado com a estratosfera, onde há UV-C e mais UV-B). Se hidratadas, mecanismos ativos de resistência destas bactérias podem contribuir para sua sobrevivência. Além disto, estarem dentro de nuvens também ajudaria a atenuar a radiação solar.

Um fato importante é que bactérias em aerossóis normalmente estão associadas a partículas maiores, da escala de alguns micrômetros, ou seja, não como células individuais (BURROWS et al., 2009). Já foi mostrado que a recuperação de *P. syringae* ainda viável de suspensões no ar é favorecida com o aumento das partículas as quais estas bactérias estão agregadas (LIGHTHART et al., 1993). Desta forma, mesmo espécies não intrinsecamente resistentes tem potencial de perdurarem viáveis por mais tempo na atmosfera. Ao final, a abundância dos microrganismos em terra pode ser decisiva. O fluxo de emissão de bactérias viáveis sobre ambientes agrícolas para o ar já foi medido na ordem de centenas de células por metro quadrado por segundo (LINDEMANN et al., 1982; LINDEMANN; UPPER, 1985). Assim, permanece provável que alguma fração desta população possa se dispersar por este meio aéreo, por mais árduo que seja.

A deposição junto com a precipitação pode ser a forma mais eficiente para *P. syringae* conseguir escapar destes estresses. Para isto, a sua capacidade de nuclear gelo, se preservada, contribuiria para a propagação destas células.

Nenhum tratamento realizado nos experimentos reduziu a atividade de nucleação a -5 °C para abaixo do limite de detecção da técnica utilizada. Ou seja, sempre houve pelo menos uma pequena proporção de células que manteve a capacidade de congelamento nesta temperatura, mesmo quando as populações foram completamente inativadas. Dado o que se conhece sobre o comportamento da nucleação de gelo em bactérias (RUGGLES; NEMECEK-MARSHALL; FALL, 1993; ATTARD et al., 2012), pode-se presumir com alguma segurança que a atividade em temperaturas inferiores, abaixo de -5 e até -10 °C, foi melhor preservada. No ambiente, em células vivas ou mortas, mesmo estes núcleos ainda seriam considerados extremamente eficientes.

Além destes objetivos principais, experimentos adicionais foram realizados para complementar o entendimento da resposta das cepas estudadas a condições presentes na atmosfera.

Células viáveis de *P. syringae* puderam ser recuperadas após serem levadas em dois voos separados por um balão até a estratosfera, sendo submetidas a um ambiente frio, rarefeito, e dessecante. A resposta das cepas variou entre os voos, o que pode estar relacionadas a fatores como o tempo de duração dos experimentos e a condições ambientais, naturalmente variáveis. As amostras mantidas expostas ao Sol nestes testes foram perdidas, mas com base nos dados da simulação multiparamétrica do topo da troposfera (cerca de 10 km) realizada em laboratório, pode-se supor que seriam fortemente inativadas pelo ultravioleta. Experimentos futuros podem aprimorar estes resultados recuperando as amostras irradiadas em outros voos de balão, e testando a exposição a intensidades menores de ultravioleta na câmara de simulação.

Em experimentos paralelos aos apresentados neste trabalho, foram realizadas tentativas de isolamento bactérias nucleadoras de gelo de amostras de neve coletadas na ilha do Rei Jorge, Antártica. Apesar das amostras em si apresentarem atividade de congelamento característico de material biológico, nenhum organismo potencialmente responsável por isto pode ser isolado. Um resumo destes experimentos se encontra no APÊNDICE B.

REFERÊNCIAS¹

- AHERN, H. E.; WALSH, K. A.; HILL, T. C. J.; MOFFETT, B. F. Fluorescent pseudomonads isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation. **Biogeosciences**, v. 4, n. 1, p. 115-124, 2007.
- ALAKOMI, H. L. **Weakening of the Gram-negative bacterial outer membrane - A tool for increasing microbiological safety**. VTT Publications, 2007. 124 p. Disponível em: <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2007/p638.pdf>>.
- ALLER, J. Y.; KUZNETSOVA, M. R.; JAHNS, C. J.; KEMP, P. F. The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols. **Journal of aerosol science**, v. 36, n. 5, p. 801-812, 2005.
- AMATO, P.; JOLY, M.; SCHAUPP, C.; ATTARD, E.; MÖHLER, O.; MORRIS, C. E.; BRUNET, Y.; DELORT, A. M. Survival and ice nucleation activity of bacteria as aerosols in a cloud simulation chamber. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 15, n. 11, p. 6455-6465, 2015.
- AMATO, P.; PARAZOLS, M.; SANCELME, M.; LAJ, P.; MAILHOT, G.; DELORT, A. M. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 2, p. 242-254, 2007.
- ANDERSON, J. A.; ASHWORTH, E. N. The effects of streptomycin, desiccation, and UV radiation on ice nucleation by *Pseudomonas viridiflava*. **Plant physiology**, v. 80, n. 4, p. 956-960, 1986.
- ARNY, D. C.; LINDOW, S. E.; UPPER, C. D. Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*. **Nature**, v. 262, p. 282 – 284, 1976.
- ASHWORTH, E. N.; KIEFT, T. L. Measurement of ice nucleation in lichens using thermal analysis. **Cryobiology**, v. 29, n. 3, p. 400-406, 1992.
- ATTARD, E.; YANG, H.; DELORT, A. M.; AMATO, P.; PÖSCHL, U.; GLAUX, C.; KOOP, T.; MORRIS, C. E. Effects of atmospheric conditions on ice nucleation activity of *Pseudomonas*. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 12, n. 22, p. 10667-10677, 2012.
- BAUER, H.; GIEBL, H.; HITZENBERGER, R.; KASPER-GIEBL, A.; REISCHL, G.; ZIBUSCHKA, F.; PUXBAUM, H. Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 108, n. D21, 2003.
- BAUER, H.; KASPER-GIEBL, A.; LÖFLUND, M.; GIEBL, H.; HITZENBERGER, R.; ZIBUSCHKA, F.; PUXBAUM, H. The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. **Atmospheric Research**, v. 64, n. 1, p. 109-119, 2002.
- BAUERMEISTER, A.; MOELLER, R.; REITZ, G.; SOMMER, S.; RETTBERG, P. Effect of relative humidity on *Deinococcus radiodurans*' resistance to prolonged

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração**. Rio de Janeiro, 2002.

desiccation, heat, ionizing, germicidal, and environmentally relevant UV radiation. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 3, p. 715-722, 2011.

BERGE, O.; MONTEIL, C. L.; BARTOLI, C.; CHANDEYSSON, C.; GUILBAUD, C.; SANDS, D. C.; MORRIS, C. E. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e105547, 2014.

BIELESKI, R. L. Sugar alcohols. In: **Plant Carbohydrates I**. Springer Berlin Heidelberg, 1982. p. 158-192.

BIELESKI, R. L.; REDGWELL, R. J. Sorbitol versus sucrose as photosynthesis and translocation products in developing apricot leaves. **Functional Plant Biology**, v. 12, n. 6, p. 657-668, 1985.

BJÖRN, Lars Olof (Ed.). **Photobiology: The Science of Light and Life**. Springer New York, NY., 2015. 444 p.

BLUMTHALER, M.; AMBACH, W.; REHWALD, W. Solar UV-A and UV-B radiation fluxes at two alpine stations at different altitudes. **Theoretical and applied climatology**, v. 46, n. 1, p. 39-44, 1992.

BOWMAN, J. S.; DEMING, J. W. Elevated bacterial abundance and exopolymers in saline frost flowers and implications for atmospheric chemistry and microbial dispersal. **Geophysical Research Letters**, v. 37, n. 13, 2010.

BULTREYS, A.; GHEYSEN, I.; MARAITE, H.; DE HOFFMANN, E. Characterization of Fluorescent and Nonfluorescent Peptide Siderophores Produced by *Pseudomonas syringae* Strains and Their Potential Use in Strain Identification. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1718-1727, 2001.

BURROWS, S. M.; ELBERT, W.; LAWRENCE, M. G.; PÖSCHL, U. Bacteria in the global atmosphere—Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 9, n. 23, p. 9263-9280, 2009.

CHAVARRÍA, M.; NIKEL, P. I.; PÉREZ-PANTOJA, D.; LORENZO, V. The Entner–Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 6, p. 1772-1785, 2013.

CHRISTNER, B. C.; MORRIS, C. E.; FOREMAN, C. M.; CAI, R.; SANDS, D. C. Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall. **Science**, v. 319, n. 5867, p. 1214-1214, 2008a.

CHRISTNER, B. C.; CAI, R.; MORRIS, C. E.; MCCARTER, K. S.; FOREMAN, C. M.; SKIDMORE, M. L.; MONTROSS, S. N.; SANDS, D. C. Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 48, p. 18854-18859, 2008b.

CID, F. P.; RILLING, J. I.; GRAETHER, S. P.; BRAVO, L. A.; MORA, M. D. L. L.; JORQUERA, M. A. Properties and biotechnological applications of ice-binding proteins in bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 11, p. fnw099, 2016.

- COCHET, N.; WIDEHEM, P. Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 153-161, 2000.
- CONSTANTINIDOU, H.; HIRANO, S. S.; BAKER, L. S.; UPPER, C. D. Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria: The role of rain. **Phytopathology**, v. 80, n. 10, p. 934-937, 1990.
- CRISLER, J. D.; NEWVILLE, T. M.; CHEN, F.; CLARK, B. C.; SCHNEEGURT, M. A. Bacterial growth at the high concentrations of magnesium sulfate found in Martian soils. **Astrobiology**, v. 12, n. 2, p. 98-106, 2012.
- DELORT, A. M.; VAÏTILINGOM, M.; JOLY, M.; AMATO, P.; WIRGOT, N.; LALLEMENT, A.; SANCELME, M.; MATULOVA, M.; DEGUILLAUME, L. Clouds: A Transient and Stressing Habitat for Microorganisms. In: **Microbial Ecology of Extreme Environments**. Springer International Publishing, 2017. p. 215-245.
- DERRIDJ, S. Nutrients on the leaf surface. In: **Aerial plant surface microbiology**. Springer US, 1996. p. 25-42.
- DIEHL, K.; MATTHIAS-MASER, S.; JAENICKE, R.; MITRA, S. K. The ice nucleating ability of pollen: Part II. Laboratory studies in immersion and contact freezing modes. **Atmospheric Research**, v. 61, n. 2, p. 125-133, 2002.
- EDWARDS, A. R.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; WICHMAN, H. A.; ORSER, C. S. Unusual pattern of bacterial ice nucleation gene evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 11, n. 6, p. 911-920, 1994.
- EKSTROM, S.; NOZIÈRE, B.; HULTBERG, M.; ALSBERG, T.; MAGNÉR, J.; NILSSON, E. D.; ARTAXO, P. A possible role of ground-based microorganisms on cloud formation in the atmosphere. **Biogeosciences**, v. 7, n. 1, p. 387-394, 2010.
- ERCOLANI, G. L.; HAGEDORN, D. J.; KELMAN, A.; RAND, R. E. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. **Phytopathology**, v. 64, n. 10, p. 1330-1339, 1974.
- FALL, R.; SCHNELL, R. C. Association of an ice-nucleating pseudomonad with cultures of the marine dinoflagellate, *Heterocapsa niei*. **Journal of marine research**, v. 43, n. 1, p. 257-265, 1985.
- FAN, J.; WANG, Y.; ROSENFELD, D.; LIU, X. Review of Aerosol–Cloud Interactions: Mechanisms, Significance, and Challenges. **Journal of the Atmospheric Sciences**, v. 73, n. 11, p. 4221-4252, 2016.
- FARCI, D.; SLAVOV, C.; TRAMONTANO, E.; PIANO, D. The S-layer Protein DR_2577 Binds Deinoxanthin and under Desiccation Conditions Protects against UV-Radiation in *Deinococcus radiodurans*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 155, 2016.
- IORE, A.; MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; SALZANO, A. M.; SCALONI, A.; GRGURINA, I.; FULLONE, M. R.; GALLO, M.; SWASEY, C.; FOGLIANO, Vi.; TAKEMOTO, J. Y. Bioactive lipopeptides of ice-nucleating snow bacterium *Pseudomonas syringae* strain 31R1. **FEMS microbiology letters**, v. 286, n. 2, p. 158-165, 2008.

- FREDRICKSON, J. K.; SHU-MEI, W. L.; GAIDAMAKOVA, E. K.; MATROSOVA, V. Y.; ZHAI, M.; SULLOWAY, H. M.; SCHOLTEN, J. C.; BROWN, M. G.; BALKWILL, D. L.; DALY, M. J. Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance?. **The ISME journal**, v. 2, n. 4, p. 393-403, 2008.
- FRÖHLICH-NOWOISKY, J.; HILL, T. C.; PUMMER, B. G.; YORDANOVA, P.; FRANC, G. D.; PÖSCHL, U. Ice nucleation activity in the widespread soil fungus *Mortierella alpina*. **Biogeosciences**, v. 12, n. 4, p. 1057, 2015.
- GARNHAM, C. P.; CAMPBELL, R. L.; WALKER, V. K.; DAVIES, P. L. Novel dimeric β -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites. **BMC structural biology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2011.
- GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003.
- GIULIVI, C.; TRAASETH, N. J.; DAVIES, K. J. A. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. **Amino acids**, v. 25, n. 3-4, p. 227-232, 2003.
- GNANAMANICKAM, S. S.; IMMANUEL, J. E. Epiphytic bacteria, their ecology and functions. **Plant-Associated Bacteria**, p. 131-153, 2006.
- GONÇALVES, F. L. T.; MASSAMBANI, O. Bacteria and fungal spores as ice nuclei from *Coffea arabica* L. **Ciência e Natura**, v. 33, n. 2, p. 73-93, 2011.
- GOODNOW, R. A.; HARRISON, M. D.; MORRIS, J. D.; SWEETING, K. B.; LADUCA, R. J. Fate of ice nucleation-active *Pseudomonas syringae* strains in alpine soils and waters and in synthetic snow samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2223-2227, 1990.
- GOVINDARAJAN, A. G.; LINDOW, S. E. Phospholipid requirement for expression of ice nuclei in *Pseudomonas syringae* and in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 19, p. 9333-9338, 1988a.
- GOVINDARAJAN, A. G.; LINDOW, S. E. Size of bacterial ice-nucleation sites measured in situ by radiation inactivation analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 5, p. 1334-1338, 1988b.
- GRAETHER, S. P.; JIA, Z. Modeling *Pseudomonas syringae* ice-nucleation protein as a β -helical protein. **Biophysical journal**, v. 80, n. 3, p. 1169-1173, 2001.
- GREEN, R. L.; WARREN, G. J. Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. **Nature**, v. 317, p. 645-648, 1985.
- GROSS, D. C.; CODY, Y. S.; PROEBSTING, E. L.; RADAMAKER, G. K.; SPOTTS, R. A. Distribution, population dynamics, and characteristics of ice nucleation-active bacteria in deciduous fruit tree orchards. **Applied and environmental microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1370-1379, 1983.
- GUNASEKERA, T. S.; SUNDIN, G. W. Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solar UVB radiation survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. **Journal of applied microbiology**, v. 100, n. 5, p. 1073-1083, 2006.

GURIAN-SHERMAN, D.; LINDOW, S. E. Ice nucleation and its application. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 303-306, 1992.

GURIAN-SHERMAN, D.; LINDOW, S. E. Differential effects of growth temperature on ice nuclei active at different temperatures that are produced by cells of *Pseudomonas syringae*. **Cryobiology**, v. 32, n. 2, p. 129-138, 1995.

HALLETT, J.; MOSSOP, S. C. The production of secondary ice particles during the riming process. **Nature**, v. 249, p. 26-28, 1974.

HARA, K.; MAKI, T.; KAKIKAWA, M.; KOBAYASHI, F.; MATSUKI, A. Effects of different temperature treatments on biological ice nuclei in snow samples. **Atmospheric environment**, v. 140, p. 415-419, 2016.

HEYMSFIELD, A. J.; MILOSHEVICH, L. M. Homogeneous ice nucleation and supercooled liquid water in orographic wave clouds. **Journal of the Atmospheric Sciences**, v. 50, n. 15, p. 2335-2353, 1993.

HILL, T. C. J.; MOFFETT, B. F.; DEMOTT, P. J.; GEORGAKOPOULOS, D. G.; STUMP, W. L.; FRANC, G. D. Measurement of ice nucleation-active bacteria on plants and in precipitation by quantitative PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1256-1267, 2014.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Ecology of ice nucleation-active bacteria. **Biological ice nucleation and its applications**, p. 41-61, 1995.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* – a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 3, p. 624-653, 2000.

HORNECK, G.; KLAUS, D. M.; MANCINELLI, R. L. Space microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 1, p. 121-156, 2010.

HUANG, T.; NICODEMUS, J.; ZARKA, D. G.; THOMASHOW, M. F.; WISNIEWSKI, M.; DUMAN, J. G. Expression of an insect (*Dendroides canadensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* results in a decrease in plant freezing temperature. **Plant molecular biology**, v. 50, n. 3, p. 333-344, 2002.

IMSHENETSKY, A. A.; LYSENKO, S. V.; KAZAKOV, G. A. Upper boundary of the biosphere. **Applied and environmental microbiology**, v. 35, n. 1, p. 1-5, 1978.

JAYAWEERA, K.; FLANAGAN, P. Investigations on biogenic ice nuclei in the Arctic atmosphere. **Geophysical Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 94-97, 1982.

JIN, Q.; THILMONY, R.; ZWIESLER-VOLLICK, J.; HE, S. Y. Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 4, p. 301-310, 2003.

JIN, J.; YURKOW, E. J.; ADLER, D.; LEE, T. C. A Novel Approach To Improve the Efficiency of Block Freeze Concentration Using Ice Nucleation Proteins with Altered Ice Morphology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017.

JOLY, M.; ATTARD, E.; SANCELME, M.; DEGUILLAUME, L.; GUILBAUD, C.; MORRIS, C. E.; AMATO, P.; DELORT, A. M.. Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water. **Atmospheric environment**, v. 70, p. 392-400, 2013.

JOLY, M.; AMATO, P.; SANCELME, M.; VINATIER, V.; ABRANTES, M.; DEGUILLAUME, L.; DELORT, A. M. Survival of microbial isolates from clouds toward simulated atmospheric stress factors. **Atmospheric environment**, v. 117, p. 92-98, 2015.

JOUNG, Y. S.; GE, Z.; BUIE, C. R. Bioaerosol generation by raindrops on soil. **Nature Communications**, v. 8, p. 14668, 2017.

JUNGE, K.; SWANSON, B. D. High-resolution ice nucleation spectra of sea-ice bacteria: implications for cloud formation and life in frozen environments. **Biogeosciences**, v. 5, n. 3, p. 865-873, 2008.

KAIRU, G. M. Biochemical and pathogenic differences between Kenyan and Brazilian isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Plant pathology**, v. 46, n. 2, p. 239-246, 1997.

KAWAGUCHI, Y.; YOKOBORI, S. I.; HASHIMOTO, H.; YANO, H.; TABATA, M.; KAWAI, H.; YAMAGISHI, A. Investigation of the Interplanetary Transfer of Microbes in the Tanpopo Mission at the Exposed Facility of the International Space Station. **Astrobiology**, v. 16, n. 5, p. 363-376, 2016.

KIM, J. J.; SUNDIN, G. W. Construction and Analysis of Photolyase Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas syringae*: Contribution of Photoreactivation, Nucleotide Excision Repair, and Mutagenic DNA Repair to Cell Survival and Mutability following Exposure to UV-B Radiation. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1405-1411, 2001.

KIM, J. J.; SUNDIN, G. W. Regulation of the *rulAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *rulAB*-mediated mutability in vitro and in planta. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 21, p. 6137-6144, 2000.

KNOPF, D. A.; ALPERT, P. A.; WANG, B.; ALLER, J. Y. Stimulation of ice nucleation by marine diatoms. **Nature Geoscience**, v. 4, n. 2, p. 88-90, 2011.

KOOP, T.; ZOBRIST, B. Parameterizations for ice nucleation in biological and atmospheric systems. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 46, p. 10839-10850, 2009.

KRISKO, A.; RADMAN, M. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 32, p. 14373-14377, 2010.

LAGRIFFOUL, A.; BOUDENNE, J. L.; ABSI, R.; BALLEST, J. J.; BERJEAUD, J. M.; CHEVALIER, S.; CREPPY, E. E.; GILLI, E.; GADONNA, J. P.; GADONAWIDHEM, P.; MORRIS, C. E.; ZINI, S. Bacterial-based additives for the production of artificial snow: What are the risks to human health?. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 7, p. 1659-1666, 2010.

- LI, J.; IZQUIERDO, M. P.; LEE, T. C. Effects of ice-nucleation active bacteria on the freezing of some model food systems. **International journal of food science & technology**, v. 32, n. 1, p. 41-49, 1997.
- LI, J.; LEE, T. C.. Bacterial ice nucleation and its potential application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 8, p. 259-265, 1995.
- LI, Q.; YAN, Q.; CHEN, J.; HE, Y.; WANG, J.; ZHANG, H.; YU, Z.; LI, L. Molecular characterization of an ice nucleation protein variant (InaQ) from *Pseudomonas syringae* and the analysis of its transmembrane transport activity in *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 8, p. 1097-1108, 2012.
- LIGHTHART, B.; SHAFFER, B. T.; MARTHI, B.; GANIO, L. M. Artificial wind-gust liberation of microbial bioaerosols previously deposited on plants. **Aerobiologia**, v. 9, n. 2, p. 189-196, 1993.
- LINDEMANN, J.; CONSTANTINIDOU, H. A.; BARCHET, W. R.; UPPER, C. D. Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1059-1063, 1982.
- LINDEMANN, J.; UPPER, C. D. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1229-1232, 1985.
- LINDOW, S. E. Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice-nucleation-active bacteria. **Plant Disease**, v. 67, n. 3, p. 327-333, 1983.
- LINDOW, S. E. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by Ice⁻ *Pseudomonas syringae* mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 2520-2527, 1987.
- LINDOW, S. E. Membrane fluidity as a factor in production and stability of bacterial ice nuclei active at high subfreezing temperatures. **Cryobiology**, v. 32, n. 3, p. 247-258, 1995.
- LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. *Erwinia herbicola*: a bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn. **Phytopathology**, v. 68, n. 3, p. 523-527, 1978.
- LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. **Plant physiology**, v. 70, n. 4, p. 1084-1089, 1982.
- LINDOW, S. E.; LAHUE, E.; GOVINDARAJAN, A. G.; PANOPOULOS, N. J.; GIES, D. Localization of ice nucleation activity and the *iceC* gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 2, n. 5, p. 262-272, 1989.
- LOHMANN, U.; FEICHTER, J. Global indirect aerosol effects: a review. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 5, n. 3, p. 715-737, 2005.
- LOHMANN, U.; LÜÖND, F.; MAHRT, F. **An introduction to clouds: From the microscale to climate**. Cambridge University Press, 2016.

- LOPER, J. E.; LINDOW, S. E. Lack of evidence for the in situ fluorescent pigment production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean leaf surfaces. **Phytopathology**, v. 77, n. 10, p. 1449-1454, 1987.
- LORV, J. S. H.; ROSE, D. R.; GLICK, B. R. Bacterial Ice Crystal Controlling Proteins. **Scientifica**, v. 2014, 2014.
- LUCCINI, E.; CEDE, A.; PIACENTINI, R. D. Effect of clouds on UV and total irradiance at Paradise Bay, Antarctic Peninsula, from a summer 2000 campaign. **Theoretical and applied climatology**, v. 75, n. 1-2, p. 105-116, 2003.
- LUNDHEIM, R.; ZACHARIASSEN, K. E. Applications of biological ice nucleators. In: **Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms**. Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 309-317.
- MAKI, L. R.; GALYAN, E. L.; CHANG-CHIEN, M. M.; CALDWELL, D. R. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. **Applied microbiology**, v. 28, n. 3, p. 456-459, 1974.
- MAKI, L. R.; WILLOUGHBY, K. J. Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. **Journal of Applied Meteorology**, v. 17, n. 7, p. 1049-1053, 1978.
- MANABE, S.; WETHERALD, R. T. Thermal Equilibrium of the Atmosphere with a Given Distribution of Relative Humidity. **Journal of the Atmospheric Sciences**, 1967.
- MARGARITIS, A.; BASSI, A. S. Principles and biotechnological applications of bacterial ice nucleation. **Critical reviews in biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 277-295, 1991.
- MASIP, L.; VEERAVALLI, K.; GEORGIOU, G. The many faces of glutathione in bacteria. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 5-6, p. 753-762, 2006.
- MASON, B. J. The growth of snow crystals. **Scientific American**, v. 204, p. 120-133, 1961.
- MATTIMORE, V.; BATTISTA, J. R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 3, p. 633-637, 1996.
- MEADOR, J. A.; BALDWIN, A. J.; PAKULSKI, J. D.; JEFFREY, W. H.; MITCHELL, D. L.; DOUKI, T. The significance of the Dewar valence photoisomer as a UV radiation-induced DNA photoproduct in marine microbial communities. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1808-1820, 2014.
- MERCIER, J.; LINDOW, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 369-374, 2000.
- MICHAUD, A. B.; DORE, J. E.; LESLIE, D.; LYONS, W. B.; SANDS, D. C.; PRISCU, J. C. Biological ice nucleation initiates hailstone formation. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 119, n. 21, 2014.
- MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 06, p. 732-749, 1938.

MILLER, C. D.; MORTENSEN, W. S.; BRAGA, G. U.; ANDERSON, A. J. The *rpoS* gene in *Pseudomonas syringae* is important in surviving exposure to the near-UV in sunlight. **Current microbiology**, v. 43, n. 5, p. 374-377, 2001.

MÖHLER, O.; DEMOTT, P. J.; VALI, G.; LEVIN, Z. Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics. **Biogeosciences**, v. 4, n. 6, p. 1059-1071, 2007.

MÖHLER, O.; GEORGAKOPOULOS, D. G.; MORRIS, C. E.; BENZ, S.; EBERT, V.; HUNSMANN, S.; SAATHOFF, H.; SCHNAITER, M.; WAGNER, R. Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: new laboratory experiments at simulated cloud conditions. **Biogeosciences**, v. 5, n. 5, p. 1425-1435, 2008.

MONTEIL, C. L.; BARDIN, M.; MORRIS, C. E. Features of air masses associated with the deposition of *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by rain and snowfall. **The ISME journal**, v. 8, n. 11, p. 2290-2304, 2014.

MOORE, E. R. B.; TINDALL, B. J.; DOS SANTOS, V. A. M.; PIEPER, D. H.; RAMOS, J. L.; PALLERONI, N. J. Nonmedical: *Pseudomonas*. In: **The Prokaryotes**. Springer New York, 2006. p. 646-703.

MORRIS, C. E.; CONEN, F.; HUFFMAN, J. A.; PHILLIPS, V.; PÖSCHL, U.; SANDS, D. C. Bioprecipitation: a feedback cycle linking Earth history, ecosystem dynamics and land use through biological ice nucleators in the atmosphere. **Global change biology**, v. 20, n. 2, p. 341-351, 2014.

MORRIS, C. E.; KINKEL, L. L.; XIAO, K.; PRIOR, P.; SANDS, D. C. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 84-92, 2007.

MORRIS, C. E., SANDS, D. (2012). **From grains to rain: the link between landscape, airborne microorganisms and climate processes**. Auto publicado, 2012. 38 p. Disponível em: <<http://prodinra.inra.fr/record/50585>>.

MORRIS, C. E.; MONTEIL, C. L.; BERGE, O. The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to Earth system processes. **Annual review of phytopathology**, v. 51, p. 85-104, 2013.

MORRIS, C. E.; SANDS, D. C.; GLAUX, C.; SAMSATLY, J.; ASAAD, S.; MOUKAHEL, A. R.; GONÇALVES, F. L. T.; BIGG, E. K. Urediospores of rust fungi are ice nucleation active at $> -10^{\circ}\text{C}$ and harbor ice nucleation active bacteria. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 13, n. 8, p. 4223-4233, 2013.

MORRIS, C. E.; SANDS, D. C.; VANNESTE, J. L.; MONTARRY, J.; OAKLEY, B.; GUILBAUD, C.; GLAUX, C. Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. **MBio**, v. 1, n. 3, p. e00107-10, 2010.

MORRIS, C. E.; SANDS, D. C.; VINATZER, B. A.; GLAUX, C.; GUILBAUD, C.; BUFFIERE, A.; YAN, S.; DOMINGUEZ, H.; THOMPSON, B. M. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. **The ISME journal**, v. 2, n. 3, p. 321-334, 2008.

MÜLMENSTÄDT, J.; SOURDEVAL, O.; DELANOË, J.; QUAAS, J. Frequency of occurrence of rain from liquid-, mixed-, and ice-phase clouds derived from A-Train satellite retrievals. **Geophysical Research Letters**, v. 42, n. 15, p. 6502-6509, 2015.

MURRAY, B. J.; O'SULLIVAN, D.; ATKINSON, J. D.; WEBB, M. E. Ice nucleation by particles immersed in supercooled cloud droplets. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 19, p. 6519-6554, 2012.

MUELLER, G. M.; WOLBER, P. K.; WARREN, G. J. Clustering of ice nucleation protein correlates with ice nucleation activity. **Cryobiology**, v. 27, n. 4, p. 416-422, 1990.

NEMECEK-MARSHALL, M.; LADUCA, R.; FALL, R. High-level expression of ice nuclei in a *Pseudomonas syringae* strain is induced by nutrient limitation and low temperature. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 13, p. 4062-4070, 1993.

NOVAKOV, T.; CORRIGAN, C. E. Cloud condensation nucleus activity of the organic component of biomass smoke particles. **Geophysical Research Letters**, v. 23, n. 16, p. 2141-2144, 1996.

O'BRIEN, R. D.; LINDOW, S. E. Effect of plant species and environmental conditions on ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* on leaves. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2281-2286, 1988.

OLAVARRIA, K.; MARONE, M. P.; DA COSTA OLIVEIRA, H.; RONCALLO, J. C.; DA COSTA VASCONCELOS, F. N.; DA SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C. Quantifying NAD(P)H production in the upper Entner–Doudoroff pathway from *Pseudomonas putida* KT2440. **FEBS open bio**, v. 5, n. 1, p. 908-915, 2015.

ORSER, C. S.; LINDOW, S.; PANAPOULOS, N. J. **Ice nucleation deficient microorganisms by genetic manipulation**. U.S. Patent n. 4,766,077, 23 ago. 1988.

PAEZ-RUBIO, T.; PECCIA, J. Estimating solar and nonsolar inactivation rates of airborne bacteria. **Journal of Environmental Engineering**, v. 131, n. 4, p. 512-517, 2005.

PALAIOMYLITOU, M. A.; KALIMANIS, A.; KOUKKOU, A. I.; DRAINAS, C.; ANASTASSOPOULOS, E.; PANOPOULOS, N. J.; EKATERINIADOU, L. V.; KYRIAKIDIS, D. A. Phospholipid Analysis and Fractional Reconstitution of the Ice Nucleation Protein Activity Purified from *Escherichia coli* Overexpressing the *inaZ* Gene of *Pseudomonas syringae*. **Cryobiology**, v. 37, n. 1, p. 67-76, 1998.

PANDEY, R.; USUI, K.; LIVINGSTONE, R. A.; FISCHER, S. A.; PFAENDTNER, J.; BACKUS, E. H. G.; NAGATA, Y.; FRÖHLICH-NOWOISKY, J.; SCHMÜSER, L.; MAURI, S.; SCHEEL, J. F.; KNOPE, D. A.; PÖSCHL, U.; BONN, M.; WEIDNER, T. Ice-nucleating bacteria control the order and dynamics of interfacial water. **Science Advances**, v. 2, n. 4, p. e1501630, 2016.

PARK, Y. S.; JEONG, H.; SIM, Y. M.; YI, H. S.; RYU, C. M. Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Type Strain ATCC 19310. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 563-567, 2014.

PARTE, A. C. LPSN– list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D613-D616, 2014.

PAULINO-LIMA, I. G. **Investigação das condições de sobrevivência de microrganismos extremófilos em ambientes extraterrestres simulados**. 2010. 256 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – IBCCF, UFRJ, Rio de Janeiro.

PEIXOTO, J. P.; OORT, A. H. The climatology of relative humidity in the atmosphere. **Journal of Climate**, v. 9, n. 12, p. 3443-3463, 1996.

PIETSCH, R. B.; DAVID, R. F.; MARR, L. C.; VINATZER, B.; SCHMALE III, D. G. Aerosolization of Two Strains (Ice+ and Ice-) of *Pseudomonas syringae* in a Collision Nebulizer at Different Temperatures. **Aerosol Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 159-166, 2015.

PIETSCH, R. B.; VINATZER, B. A.; SCHMALE III, D. G. Diversity and abundance of ice nucleating strains of *Pseudomonas syringae* in a freshwater lake in Virginia, USA. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017

POOLEY, L.; BROWN, T. A. Effects of culture conditions on expression of the ice nucleation phenotype of *Pseudomonas syringae*. **FEMS microbiology letters**, v. 77, n. 2-3, p. 229-232, 1991.

POTTS, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 4, p. 755-805, 1994.

POULEUR, S.; RICHARD, C.; MARTIN, J. G.; ANTOUN, H. Ice nucleation activity in *Fusarium acuminatum* and *Fusarium avenaceum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2960-2964, 1992.

PULSCHEN, A. A.; RODRIGUES, F.; DUARTE, R. T.; ARAUJO, G. G.; SANTIAGO, I. F.; PAULINO-LIMA, I. G.; ROSA, C. A.; KATO, M. J.; PELLIZARI, V. H.; GALANTE, D. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. **MicrobiologyOpen**, v. 4, n. 4, p. 574-588, 2015.

PUMMER, B. G.; BAUER, H.; BERNARDI, J.; BLEICHER, S.; GROTHE, H. Suspendable macromolecules are responsible for ice nucleation activity of birch and conifer pollen. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 12, n. 5, p. 2541-2550, 2012.

PUMMER, B. G.; BUDKE, C.; AUGUSTIN-BAUDITZ, S.; NIEDERMEIER, D.; FELGITSCH, L.; KAMPF, C. J.; HUBER, R. G.; LIEDL, K. R.; LOERTING, T.; MOSCHEN, T.; SCHAUPERL, M.; TOLLINGER, M.; MORRIS, C. E.; WEX, H.; GROTHE, H.; PÖLSCH, U.; KOOP, T.; FRÖHLICH-NOWOISKY, J. Ice nucleation by water-soluble macromolecules. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 15, n. 8, p. 4077-4091, 2015.

RENARD, P.; CANET, I.; SANCELME, M.; WIRGOT, N.; DEGUILLAUME, L.; DELORT, A. M. Screening of cloud microorganisms isolated at the Puy de Dôme (France) station for the production of biosurfactants. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 16, n. 18, p. 12347-12358, 2016.

RICO, A.; PRESTON, G. M. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients

that are abundant in the tomato apoplast. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 21, n. 2, p. 269-282, 2008.

RIXEN, C.; STOECKLI, V.; AMMANN, W. Does artificial snow production affect soil and vegetation of ski pistes? A review. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, n. 4, p. 219-230, 2003.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092-1101, 2001.

RUGGLES, J. A.; NEMECEK-MARSHALL, M.; FALL, R. Kinetics of appearance and disappearance of classes of bacterial ice nuclei support an aggregation model for ice nucleus assembly. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 22, p. 7216-7221, 1993.

SANDS, D. C.; LANGHANS, V. E.; SCHAREN, A. L.; DE SMET, G. The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications. **Időjárás - Quarterly Journal of the Hungarian Meteorological Service**, v. 86, n. 2-4, p. 148-152, 1982.

ŠANTL-TEMKIV, T.; SAHYOUN, M.; FINSTER, K.; HARTMANN, S.; AUGUSTIN, S.; STRATMANN, F.; WEX, H.; CLAUSS, T.; NIELSEN, N. W.; SØRENSEN, J. H.; KORSHOLM, U. S.; WICK, L. Y.; KARLSON, U. G. Characterization of airborne ice-nucleation-active bacteria and bacterial fragments. **Atmospheric environment**, v. 109, p. 105-117, 2015.

SANTOS, A. L.; OLIVEIRA, V.; BAPTISTA, I.; HENRIQUES, I.; GOMES, N. C.; ALMEIDA, A.; CORREIA, A.; CUNHA, Â. Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. **Archives of microbiology**, v. 195, n. 1, p. 63-74, 2013.

SARKAR, S. F.; GUTTMAN, D. S. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 1999-2012, 2004.

SAXENA, V. K. Evidence of the biogenic nuclei involvement in Antarctic coastal clouds. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 87, n. 21, p. 4130-4134, 1983.

SCHLATTER, T. W. Vertical Structure of the Atmosphere. In: **Encyclopedia of Aerospace Engineering**, John Wiley & Sons, 2010. 11 pp.

SCHMID, D.; PRIDMORE, D.; CAPITANI, G.; BATTISTUTTA, R.; NEESER, J. R.; JANN, A. Molecular organisation of the ice nucleation protein InaV from *Pseudomonas syringae*. **FEBS letters**, v. 414, n. 3, p. 590-594, 1997.

SCHROTH, M. N.; HILDEBRAND, D. C.; PANOPOULOS, N. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. In: **The Prokaryotes**. Springer New York, 2006. p. 714-740.

SCHNELL, R. C.; VALI, G. Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation. **Nature**, v. 236, p. 163-165, 1972.

SINGH, S.; KOEHLER, B.; FETT, W. F. Effect of osmolarity and dehydration on alginate production by fluorescent pseudomonads. **Current microbiology**, v. 25, n. 6, p. 335-339, 1992.

SKIRVIN, R. M.; KOHLER, E.; STEINER, H.; AYERS, D.; LAUGHNAN, A.; NORTON, M. A.; WARMUND, M. The use of genetically engineered bacteria to control frost on strawberries and potatoes. Whatever happened to all of that research?. **Scientia horticulturae**, v. 84, n. 1, p. 179-189, 2000.

SLADE, D.; RADMAN, M. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 133-191, 2011.

SMITH, D. J.; GRIFFIN, D. W.; MCPETERS, R. D.; WARD, P. D.; SCHUERGER, A. C. Microbial survival in the stratosphere and implications for global dispersal. **Aerobiologia**, v. 27, n. 4, p. 319-332, 2011.

SMITH, D. J.; THAKRAR, P. J.; BHARRAT, A. E.; DOKOS, A. G.; KINNEY, T. L.; JAMES, L. M.; LANE, M. A.; KHODADAD, C. L.; MAGUIRE, F.; MALONEY, P. R.; DAWKINS, N. L. A Balloon-Based Payload for Exposing Microorganisms in the Stratosphere (E-MIST). **Gravitational and Space Research**, v. 2, n. 2, 2014.

SMITH, D. J. Microbes in the Upper Atmosphere and Unique Opportunities for Astrobiology Research. **Astrobiology**, v. 13, n. 10, p. 981-990, 2013.

SNYDER, R. L.; MELO-ABREU, J. P. **Frost protection: fundamentals, practice and economics**, v. 1. Roma: FAO, 2005. 240 p. (FAO Environment and Natural Resources Service Series, n. 10)

STEVENSON, A.; CRAY, J. A.; WILLIAMS, J. P.; SANTOS, R.; SAHAY, R.; NEUENKIRCHEN, N.; MCCLURE, C. D.; GRANT, I. R.; HOUGHTON, J. D. R.; QUINN, J. P.; TIMSON, D. J.; PATIL, S. V.; SINGHAL, R. S.; ANTÓN, J.; DIJKSTERHUIS, J.; HOCKING, A. D.; LIEVENS, B.; RANGEL, D. E. N.; VOYTEK, M. A.; GUNDE-CIMERMAN, N.; OREN, A.; TIMMIS, K. N.; MCGENITY, T. J.; HALLSWORTH J. E. Is there a common water-activity limit for the three domains of life?. **The ISME journal**, v. 9, n. 6, p. 1333-1351, 2015.

STOPELLI, E.; CONEN, F.; MORRIS, C. E.; HERRMANN, E.; BUKOWIECKI, N.; ALEWELL, C. Ice nucleation active particles are efficiently removed by precipitating clouds. **Scientific reports**, v. 5, p. 16433-16433, 2015.

STOPELLI, E.; CONEN, F.; GUILBAUD, C.; ZOPFI, J.; ALEWELL, C.; MORRIS, C. E. Ice nucleators, bacterial cells and *Pseudomonas syringae* in precipitation at Jungfraujoch. **Biogeosciences**, v. 14, n. 5, p. 1189-1196, 2017.

STORELVMO, T.; HOOSE, C.; ERIKSSON, P. Global modeling of mixed-phase clouds: The albedo and lifetime effects of aerosols. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 116, n. D5, 2011.

SUN, J.; ARIYA, P. A. Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review. **Atmospheric environment**, v. 40, n. 5, p. 795-820, 2006.

SUNDIN, G. W.; BENDER, C. L. Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1018-1024, 1993.

SUNDIN, G. W.; MURILLO, J. Functional analysis of the *Pseudomonas syringae* *ruLAB* determinant in tolerance to ultraviolet B (290–320 nm) radiation and distribution

of *ruAB* among *P. syringae* pathovars. **Environmental microbiology**, v. 1, n. 1, p. 75-87, 1999.

TAN, I.; STORELVMO, T.; CHOI, Y. S. Spaceborne lidar observations of the ice-nucleating potential of dust, polluted dust, and smoke aerosols in mixed-phase clouds. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 119, n. 11, p. 6653-6665, 2014.

TEMPLE, T. N.; STOCKWELL, V. O.; LOPER, J. E.; JOHNSON, K. B. Bioavailability of iron to *Pseudomonas fluorescens* strain A506 on flowers of pear and apple. **Phytopathology**, v. 94, n. 12, p. 1286-1294, 2004.

TORRES, L.; PÉREZ-ORTÍN, J. E.; TORDERA, V.; BELTRÁN, J. P. Isolation and characterization of an Fe (III)-chelating compound produced by *Pseudomonas syringae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 52, n. 1, p. 157-160, 1986.

TURNER, M. A.; ARELLANO, F.; KOZLOFF, L. M. Components of ice nucleation structures of bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 20, p. 6515-6527, 1991.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D158-D169, 2017.

VÄTILINGOM, M.; ATTARD, E.; GAIANI, N.; SANCELME, M.; DEGUILLAUME, L.; FLOSSMANN, A. I.; AMATO, P.; DELORT, A. M. Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France). **Atmospheric environment**, v. 56, p. 88-100, 2012.

VALI, G. Quantitative evaluation of experimental results an the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. **Journal of the Atmospheric Sciences**, v. 28, n. 3, p. 402-409, 1971.

VALI, G. Principles of ice nucleation. **Biological ice nucleation and its applications**, p. 1-28, 1995.

VAN BLOOIS, E.; WINTER, R. T.; KOLMAR, H.; FRAAIJE, M. W. Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 79-86, 2011.

VAN DIJK, K.; FOUTS, D. E.; REHM, A. H.; HILL, A. R.; COLLMER, A.; ALFANO, J. R. The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature-and pH-sensitive manner. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4790-4797, 1999.

VONNEGUT, B. The nucleation of ice formation by silver iodide. **Journal of applied physics**, v. 18, n. 7, p. 593-595, 1947.

WARD, P. J.; DEMOTT, P. J. Preliminary experimental evaluation of Snomax Snow Inducer, *Pseudomonas syringae*, as an artificial ice nucleus for weather modification. **Journal of Weather Modification**, v. 21, p. 9-13, 1989.

WATURANGI, D. E. Distribution of ice nucleation-active (INA) bacteria from rain-water and air. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 18, n. 3, p. 108-112, 2011.

WEI, Z. M.; SNEATH, B. J.; BEER, S. V. Expression of *Erwinia amylovora hrp* genes in response to environmental stimuli. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 6, p. 1875-1882, 1992.

WEX, H.; AUGUSTIN-BAUDITZ, S.; BOOSE, Y.; BUDKE, C.; CURTIUS, J.; DIEHL, K.; DREYER, A.; FRANK, F.; HARTMANN, S.; HIRANUMA, N.; JANTSCH, E.; KANJI, Z. A.; KISELEV, A.; KOOP, T.; MÖHLER, O.; NIEDERMEIER, D.; NILLIUS, B.; RÖSCH, M.; ROSE, D.; SCHMIDT, C.; STEINKE, I.; STRATMANN, F. Intercomparing different devices for the investigation of ice nucleating particles using Snomax® as test substance. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 15, n. 3, p. 1463-1485, 2015.

WIDHEM, P.; COCHET, N. *Pseudomonas syringae* as an ice nucleator — application to freeze-concentration. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 405-410, 2003.

WILKINSON, D. M.; KOUMOUTSARIS, S.; MITCHELL, E. A.; BEY, I. Modelling the effect of size on the aerial dispersal of microorganisms. **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 1, p. 89-97, 2012.

WILSON, S. L.; KELLEY, D. L.; WALKER, V. K. Ice-active characteristics of soil bacteria selected by ice-affinity. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1816-1824, 2006.

WINSTON, P. W.; BATES, D. H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, v. 41, n. 1, p. 232-237, 1960.

WOLBER, P. K.; DEININGER, C. A.; SOUTHWORTH, M. W.; VANDEKERCKHOVE, J.; VAN MONTAGU, M.; WARREN, G. J. Identification and purification of a bacterial ice-nucleation protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 19, p. 7256-7260, 1986.

WOLBER, P. K.; GREEN, R. L. **Bacterial detection by phage transduction of ice nucleation and other phenotypes**. U.S. Patent n. 5,447,836, 5 set. 1995.

WOLBER, P. K.; GREEN, R. L. New rapid method for the detection of *Salmonella* in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 1, p. 80-82, 1990.

WOLBER, P.; WARREN, G. Bacterial ice-nucleation proteins. **Trends in biochemical sciences**, v. 14, n. 5, p. 179-182, 1989.

YANG, Y.; YOKOBORI, S. I.; YAMAGISHI, A. Assessing panspermia hypothesis by microorganisms collected from the high altitude atmosphere. **Biological Sciences in Space**, v. 23, n. 3, p. 151-163, 2009.

YANKOFSKY, S. A.; LEVIN, Z.; BERTOLD, T.; SANDLERMAN, N. Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei. **Journal of applied meteorology**, v. 20, n. 9, p. 1013-1019, 1981.

YOUNG, J. M.; LUKETINA, R. C.; MARSHALL, A. M. The effects on temperature on growth in vitro of *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas pruni*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 345-354, 1977.

YU, J.; PEÑALOZA-VÁZQUEZ, A.; CHAKRABARTY, A. M.; BENDER, C. L. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of

Pseudomonas syringae pv. *syringae*. **Molecular microbiology**, v. 33, n. 4, p. 712-720, 1999.

YUCEL, I. R. E. M.; XIAO, Y. X.; HUTCHESON, S. W. Influence of *Pseudomonas syringae* culture conditions on initiation of the hypersensitive response of culture tobacco cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 7, p. 1724-1729, 1989.

ZHOU, Z.; JIN, J.; YUE, T.; LEE, T. C. Optimization of covalent immobilization of extracellular ice nucleators from *Erwinia herbicola* on magnetic Fe₃O₄/chitosan nanoparticles for potential application in freeze concentration. **Food and bioprocess technology**, v. 7, n. 11, p. 3259-3268, 2014.

APÊNDICE A - Aplicações biotecnológicas da nucleação de gelo biológica

As excepcionais propriedades de nuclear gelo de *P. syringae* já foram estudadas para diversas aplicações biotecnológicas. Provavelmente, o produto derivado dela com maior sucesso foi “Snomax”, patenteado nos anos 80 nos Estados Unidos pela empresa *Advanced Genetic Sciences* em parceria com a *Kodak* (atualmente pertencente a outro grupo). Trata-se de um extrato em pó de células secas de *P. syringae*, inativadas por radiação gama. É comercializado principalmente para resorts de esqui gerarem neve com maior facilidade a partir de sprays de água, gastando menos energia. Foi estimado que este ganho de eficiência contribuiu para uma economia de ao menos 100 milhões de dólares por ano em custos energéticos em estações de esqui canadenses (SKIRVIN et al., 2000). O uso apropriado de produtos assim foi considerado seguro nos âmbitos de proteção ambiental (GOODNOW et al., 1990; SKIRVIN et al., 2000) e de saúde humana (LAGRIFFOUL et al., 2010), ainda que alguns autores apontem possíveis impactos negativos à vegetação (RIXEN; STOECKLI; AMMANN, 2003) e a comunidades de fungos no solo (FIORE et al., 2008).

Além destas aplicações, já foi proposto o uso de Snomax na semeadura de nuvens para induzir precipitação, visto que apresenta atividade maior até do que o iodeto de prata tradicionalmente empregado como nucleador de gelo inorgânico em manipulação climática (WARD; DEMOTT, 1989). O legado científico deste produto é ser uma forma prática de trabalhar com nucleação de gelo biológica a partir de um substrato relativamente padronizado, sem necessitar do cultivo de microrganismos (MÖHLER et al., 2008; WEX et al., 2015).

Foi também estudado como essas bactérias e suas proteínas de nucleação podem ser aplicadas no congelamento de produtos alimentícios. Demonstrou-se o seu potencial para aumentar a velocidade do congelamento, reduzindo os custos de refrigeração (LI; LEE, 1995). Seu uso poderia adicionalmente contribuir para a qualidade em fatores bromatológicos como texturização e manutenção do sabor (LI; IZQUIERDO; LEE, 1997). Ainda na indústria de alimentos, foi proposta também sua aplicação em processos de concentração de grandes volumes de produtos líquidos por congelamento (JIN et al., 2017; WIDHEM; COCHET, 2003; ZHOU et al., 2014).

O uso microrganismos nucleadores de gelo já foi pesquisado como uma forma de controle de insetos-praga na agricultura. Muitos destes insetos, como alguns besouros,

sobrevivem ao frio entrando em estado de super-resfriamento, o que pode efetivamente ser inibido por bactérias como *P. syringae*. Foi demonstrado que a aplicação destes microrganismos, seja por ingestão ou externamente, torna estes insetos mais vulneráveis às baixas temperaturas (LUNDHEIM; ZACHARIASSEN, 1999).

No nível da biologia molecular, os mecanismos celulares ligados à geração da proteína nucleadora de gelo já foram bem caracterizados, como mencionado anteriormente. Utilizando ela, um ensaio para a detecção de *Salmonella* (com o nome comercial “BIND” – *Bacterial Ice Nucleation Diagnostic*) foi desenvolvido como produto no começo dos anos 90 pela empresa *DNA Plant Technology Corporation*. Bacteriófagos que atacam especificamente este gênero bacteriano foram incorporados com uma variante do gene necessário para a produção desta proteína. As bactérias desta espécie reconhecidas e atacadas pelo vírus passam a expressar o componente de nucleação de gelo, que passa a agir como um gene repórter. Assim, sua presença pode ser facilmente revelada pelas amostras tratadas que congelam quando resfriadas até determinada temperatura, enquanto os controles permanecem líquidos. Isto constituiu um teste rápido e sensível para a detecção de alimentos contaminados com cepas potencialmente perigosas de *Salmonella* (WOLBER; GREEN, 1990; WOLBER; GREEN, 1995). Outros usos de *inaZ* como um gene repórter particularmente sensível, não necessariamente para diagnóstico, também foram relatados (KIM; SUDIN, 2000; TEMPLE et al., 2004; entre outros trabalhos).

Outra propriedade de interesse da proteína de nucleação de gelo é sua eficiente ancoragem na membrana externa e exposição na superfície da célula. Partes da sua sequência, contendo a região N-terminal em particular, foram usadas em pesquisas para o direcionamento subcelular de proteínas recombinantes de fusão em diferentes espécies de bactérias (COCHET; WIDHEM, 2000; LI et al., 2012; VAN BLOOIS et al., 2011).

Nos anos 80, *P. syringae* recebeu grande notoriedade ao ser o primeiro organismo com o genoma modificado pelas então nascentes técnicas de engenharia genética a ser testado no campo. Pesquisadores excisaram o gene da proteína de nucleação de gelo em uma cepa desta bactéria e requisitaram às agências regulatórias do governo dos Estados Unidos, através da empresa *Advanced Genetic Sciences*, para liberá-la em condições controladas no ambiente para testar sua eficiência no controle de danos de geada (LINDOW, 1987; MORRIS; SANDS, 2012; ORSER; LINDOW; PANAPOULOS,

1988). A ideia do projeto seria que adicionar bactérias não-nucleadoras nas plantas, que competiriam de igual para igual nos mesmos nichos, poderia ajudar a reduzir a população de bactérias efetivamente nucleadoras, e assim minimizar o congelamento sob condições climáticas adversas (SNYDER; MELO-ABREU, 2005). Este evento acarretou a formação de movimentos ativistas e uma forte pressão social contra a liberação no ambiente de organismos geneticamente modificados (MORRIS; SANDS, 2012). Apesar das controvérsias, a tecnologia eventualmente conseguiu ser testada com sucesso em campo. O produto desenvolvido, chamado “Frostban”, acabou por nunca ser lançado no mercado. Contudo, outro preparo contendo apenas cepas naturalmente (não engenherada) não produtoras de núcleos de gelo de *Pseudomonas fluorescens*, com a nova marca “Blightban”, foi comercializado como um defensivo contra a doença do fogo bacteriano (causada por *Erwinia amylovora*) e também contra geadas. Seu registro federal como pesticida biológico nos Estados Unidos não sofreu mais protestos ou entraves (MILLER, 2010; SKIRVIN et al., 2000).

APÊNDICE B - Isolamentos de amostras de neve coletadas na Antártica

Em um projeto paralelo ao principal com as cepas de *P. syringae*, buscou-se isolar novas cepas de microrganismos com atividade de nucleação de gelo em amostras de neve coletadas na ilha do Rei Jorge, Antártica, durante a XXXIII Operação Antártica Brasileira (2014/2015) e de uma amostra da Operação de 2013/2014 (designada “AV”), listadas na Tabela A 1. Com pás flambadas, as amostras de neve fresca (precipitação recente) foram coletadas das camadas mais superficiais (máximo de 2 cm) para garantir sua pureza evitando contaminações do solo subjacente. Armazenadas em sacos para autoclave (esterilizados em autoclave), foram mantidas a -20 °C desde a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), durante seu transporte para o laboratório no Brasil, e até serem processadas meses depois.

Tabela A 1 - Lista de amostras de neve processadas.

Amostra	Data	Hora	Local aproximado	Latitude	Longitude	Altitude GPS (m)	Temp. (°C)
P13	03/01/15	10:20	Geleira Znosko / Machu Pichu	-62,095440	-58,477460	119	ca. 0
P14	03/01/15	10:55	Geleira Znosko / Machu Pichu	-62,095890	-58,478710	116	ca. 0
P15	03/01/15	11:10	Geleira Znosko / Machu Pichu	-62,096300	-58,478000	94	ca. 0
P16	05/01/15	14:45	Encosta do Morro da Cruz	-62,084267	-58,408667	145	ca. 0
P17	05/01/15	15:00	Encosta do Morro da Cruz	-62,085667	-58,407700	147	ca. -2
P18	05/01/15	15:10	Encosta do Morro da Cruz	-62,086117	-58,404433	90	ca. -2
P19	05/01/15	20:30	Praia EACF	-62,086550	-58,391583	7	ca. -2
P20	06/01/15	12:30	Praia EACF	-62,087400	-58,393567	2	ca. -2
P21	06/01/15	12:30	Praia EACF	-62,086717	-58,392467	6	ca. -2
AV	02/14	-	Demay Point	-62,22	-58,439720	~0	-

Figura A 1 - Pontos de coletas das amostras na Ilha do Rei George, Antártica. Setas azuis indicam as amostras coletadas na XXXIII Operação Antártica Brasileira (2014/2015), próximas a Estação Antártica Comandante Ferraz. A seta vermelha indica Demay Point, onde foi coletada a amostra “AV” na Operação de 2013/2014.

Fonte: Google Maps

Amostras de 10 pontos de coleta foram processadas no total (marcadas na Figura A 1), nomeadas em ordem de P13 até P21, mais AV (marcada em vermelho no mapa). Volumes de 2 a 4 litros de gelo foram descongelados a temperatura ambiente dentro de um béquer de 4 litros esterilizado em autoclave, dentro de uma cabine de fluxo laminar. O líquido se manteve frio até o final do descongelamento. Imediatamente, foram concentrados determinados volumes de amostra em membranas estéreis Millipore de 47 mm de diâmetro sobre um sistema de vidro de filtração a vácuo, esterilizado em autoclave.

Diferentes estratégias foram aplicadas para o isolamento de microrganismos das amostras. Material particulado maior que 0,22 µm retido nas membranas foi

ressuspensão em volumes de NaCl 0,9% de 10 a 200 x menores que os volumes totais filtrados, e usado para inocular placas de meios solidificados com ágar, espalhados por uma alça de Drigalski. Volumes menores de amostra (50-200 ml) foram concentrados sobre membranas com tamanho de poros de 0,45 µm que foram então diretamente aplicadas sobre os meios para que, durante a incubação, as colônias crescessem sobre sua superfície. Em outra estratégia semelhante, algumas destas membranas foram posicionadas dentro de placas de Petri sobre suportes de celulose (pads, da marca Millipore) saturados com meio de cultura líquido, sem ágar (o que poderia ser útil para o isolamento de organismos sensíveis a este agente gelificante). Diferentes composições de meio foram testadas, incluindo diferenciais para *Pseudomonas* (KB), para bactérias de água doce (R2A), do ambiente marinho (ágar marinho, MA), entre outros. Uma composição seletiva para *Pseudomonas* testada foi meio KB acrescido do agente antimicrobiano CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio, MOORE et al., 2006). Todas as placas foram incubadas em estufa a 20 °C por pelo menos 2 meses em sacos plásticos não completamente selados, para evitar a perda de água, mas manter a troca de ar. Uma lanterna LED com emissão no UV-A próximo (pouco abaixo de 400 nm) foi utilizada para inspeção das colônias crescidas em KB para a produção de pioverdina, característica de *Pseudomonas*, que apresenta fluorescência azulada.

Alíquotas das amostras descongeladas, e de suas soluções concentradas, foram tomadas para testes de nucleação de gelo, como descritos anteriormente. A atividade de nucleação de gelo foi estudada individualmente para isolados selecionados após repique em novas placas. As colônias foram raspadas e suspensas em NaCl 0,9% para uma concentração alta arbitrária, aproximadamente entre DO 0,5 e 2,0, para garantir uma grande quantidade de células sem que a solução ficasse muito turva, o que dificultaria visualizar o congelamento. De 8 a 32 gotas (16 para a grande maioria) de 10 µl de cada isolado foram pingadas sobre a bandeja recoberta com parafina com a qual foi realizada o experimento. Prestou-se especial atenção a eventos de congelamento acima de -10 °C, faixa onde estão ativos os núcleos de gelo biológico mais eficientes, como os de *P. syringae*.

Resultados e discussão

Figura A 2 - Concentração de núcleos de gelo, corrigida para o volume total descongelado, de amostras de neve coletadas na Antártica.

As amostras de neve descongeladas e concentradas apresentaram atividade de nucleação de gelo pouco frequente, mas presente em temperaturas normalmente atribuídas a núcleos biológicos (Figura A 2). Christner e colaboradores (2008a) avaliaram a presença de nucleadores de gelo em amostras de neve coletadas em locais isolados nos Estados Unidos, na França, e uma única amostra da ilha de Ross, Antártica. Esta última apresentou a atividade de exatamente 1 núcleo cumulativo acima de -7°C (chegando a 4 núcleos a -9°C), a menor de todas as testadas. Em comparação, 8 das 10 amostras testadas neste trabalho apresentaram no mínimo 10 x mais congelamento para a mesma temperatura. As metodologias de processamento das amostras foram semelhantes (concentração de partículas maiores que $0,22\ \mu\text{m}$), exceto que neste trabalho a ressuspensão foi realizada com solução salina, mais biocompatível que a H_2O deionizada utilizada no trabalho de Christner.

De qualquer maneira, no trabalho de Christner e colaboradores (2008a), é afirmado que os núcleos biológicos detectados (dados de congelamento cruzados com a

concentração núcleos sensíveis à lisozima e ao calor, e com a quantidade de partículas contendo DNA) provavelmente foram transportados por grandes distâncias pela atmosfera de ambientes mais amenos, com vegetação, até os pontos de coleta (em épocas e locais sem plantas decíduas). Isto desconsidera fontes não canônicas destes núcleos (dessemelhantes a *P. syringae*, originária de plantas), que poderiam ser solos e até o oceano.

A superfície do mar é eficiente em produzir aerossóis enriquecidos com bactérias através da erupção de bolhas (ALLER et al., 2005). Em ambientes de clima polar, um mecanismo adicional são as “flores de geada”, pequenas protrusões de cristais de gelo formadas sobre gelo marinho. São capazes de concentrar sais e bactérias durante a sua formação, produzindo aerossóis com estes materiais ao serem erodidas pelo vento. No limite superior de temperatura para seu crescimento, -8 °C, núcleos de gelo biológicos podem ter algum papel (BOWMAN; DEMING, 2010). Já foram apresentadas evidências da atividade de núcleos biogênicos em nuvens costeiras na Antártica, de fonte sugerida como marinha (SAXENA, 1983). Por outro lado, diversas bactérias isoladas de gelo marinho só apresentaram congelamento em temperaturas próximas de -40 °C, aproximando-se do ponto de nucleação homogênea da água (JUNGE; SWANSON, 2008).

Com estes dados, poderia se esperar a presença de organismos mais distantes de *P. syringae*, filogeneticamente e ecologicamente, que fossem os responsáveis pela atividade de nucleação medida nas amostras. A vantagem de se aplicar o cultivo e isolamento em relação a técnicas moleculares (como metagenômica) seria justamente a obtenção de novas cepas que estariam disponíveis para outros experimentos, rendendo mais resultados de interesse. Entretanto, há plena ciência das limitações desta abordagem, principalmente no que tange a significativamente reduzida cultivabilidade de organismos ambientais em condições de laboratório.

Figura A 3 - Concentração de unidades formadoras de colônia (UFC) cultivadas por litro de amostra em três diferentes meios: R2A, KB, e ágar marinho (AM).

Exceto por uma amostra, em que havia a presença de uma comunidade de algas vermelhas “AV”, para todas as outras se obteve apenas um pequeno número de colônias por placa. A concentração de UFC recuperadas por mililitro de neve foi, em geral, abaixo de 1 em placas R2A e menor ainda em placas KB. Em metade das amostras nenhum isolado foi obtido em placas de meio ágar marinho. (Figura A 3). Notou-se a baixa representatividade de fungos filamentosos nas placas, onde surgiram muito mais colônias características de bactérias ou leveduras, isto é, sem hifas aparentes.

Foram procurados especificamente membros do gênero *Pseudomonas*. Boa parte destas bactérias são facilmente reconhecíveis pela produção de pioverdina, inspecionada sob luz UV-A. Nenhum isolado apresentou esta característica.

Visto que não surgiram candidatos evidentes como *Pseudomonas*, a atividade de nucleação de gelo de mais de 170 outros isolados foram testados individualmente em uma triagem de cepas. A absoluta maioria destes organismos não apresentou nenhuma atividade de nucleação de gelo mesmo nas temperaturas mais baixas testadas (dados não

mostrados). Alguns poucos apresentaram congelamento, mas em temperaturas bastante inferiores às que os organismos nucleadores tradicionalmente estudados são ativos (acima de -10 °C).

De todas as amostras, apenas 3 isolados tiveram qualquer indício de atividade semelhante a *P. syringae*, acima de -10 °C. Contudo, estas observações não puderam ser reproduzidas em repetições destes experimentos. Assim, apesar de partículas concentradas das amostras apresentarem substancial atividade de congelamento (Figura A 2), semelhante à de microrganismos como *Pseudomonas*, nenhuma bactéria possivelmente responsável por isto pode ser cultivada.

Além do problema da cultivabilidade, a baixa recuperação de células pode também se dever ao próprio ambiente da neve não ser propício para a sobrevivência de bactérias. Especificamente para *P. syringae*, foi mostrado que sua viabilidade em amostras de neve artificiais expostas a luz solar caiu para níveis indetectáveis após 7 dias, enquanto sua atividade de nucleação foi reduzida em mais de 100 x (GOODNOW et al., 1990). Nestes experimentos as amostras estavam em um ambiente aberto em que houve ciclos de congelamento e descongelamento, o que sabe ser um fator deletério (CRISLER et al., 2012). Para as amostras coletadas durante o verão Antártico, a probabilidade de isto ocorrer é reduzida, mas não pode ser descartada. Adicionalmente, a depleção (por ação antrópica) do ozônio estratosférico na região aumenta a incidência de radiação UV-B (LUCCINI; CEDE; PIACENTINI, 2003), o que contribuiria para mais estresse para as células. Não se sabe o período que a neve coletada permaneceu exposta, mas sua precipitação recente e baixa compactação não sugerem um intervalo excessivamente longo.

A amostra AV, mais rica, é bastante distinta em relação às outras. Sua alta carga microbiana possivelmente se deve a instalação de uma comunidade fotossintética de algas e provável contaminação local, seja pelo solo, pelo mar, ou por animais. Certamente, reflete muito pouco a diversidade real de microrganismos da neve recém-caída.

A principal vantagem dos cultivos diretamente sobre as membranas de filtração é a possibilidade de se realizar inóculos equivalentes a volumes muito maiores de material da amostra para áreas de isolamento muito menores. Ao invés de se utilizar várias placas, pode-se utilizar apenas uma membrana. Isto é especialmente útil ao se trabalhar

com amostras tão escassas em células viáveis como neste trabalho. Quanto às culturas sobre os pads de celulose, não parece ter havido um ganho substancial de cultivabilidade em relação a organismos sensíveis a impurezas do ágar. Na realidade, descobriu-se que esta metodologia não é própria para isolamentos com incubação por grandes períodos (semanas), pois os pads retêm muito pouco a água e secam facilmente. Foi necessário acompanhá-los de perto, recuperando a umidade condensada nas tampas das placas (cultivadas para cima) e a reintroduzindo na beirada dos pads com um pipetador dentro de uma cabine de fluxo laminar. O preparo de meio KB adicionado de um agente seletivo para *Pseudomonas*, CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), não rendeu nenhum isolado de qualquer tipo em todas as amostras.

Concluindo, amostras de neve coletadas na Antártica apresentaram atividade de nucleação de gelo significativa, compatível com o que se esperaria para núcleos de congelamento biológicos. Contudo, diferentes metodologias de cultivo não foram capazes de recuperar em laboratórios os microrganismos que potencialmente seriam responsáveis por isto.