

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL  
CÂMPUS APUCARANA/LONDRINA**

**GABRIELA SALLES TSAY**

**COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA CULTIVÁVEL DO GRANIZO DE UMA  
TEMPESTADE NO SUDOESTE DO PARANÁ**

**DISSERTAÇÃO**

**LONDRINA  
2017**

**GABRIELA SALLES TSAY**

**COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA CULTIVÁVEL DO GRANIZO DE UMA  
TEMPESTADE NO SUDOESTE DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana e Londrina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Ambiental. Área de Concentração: Poluição do ar e processos atmosféricos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Martins  
Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia

LONDRINA  
2017

## TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

T877c Tsay, Gabriela Salles  
Composição microbiológica cultivável do granizo de uma tempestade no sudoeste do Paraná / Gabriela Salles Tsay. – Londrina: [s.n.], 2017.  
72 f. : il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Martins  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Furlaneto-Maia  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2017.  
Bibliografia: f. 51-69

1. Cristais de Gelo. 2. Bactérias. 3. Microorganismos. I. Martins, Jorge Alberto, orient. II. Furlaneto-Maia, Luciana, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. V. Título.

CDD: 628



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Pró-reitora de Pesquisa e Pós Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental  
Campus Apucarana/Londrina



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA CULTIVÁVEL DO GRANIZO DE UMA TEMPESTADE NO SUDOESTE DO PARANÁ**

por

**Gabriela Salles Tsay**

Dissertação de mestrado apresentada no dia 28 de julho de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Campus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

---

Prof. Dr. – Jorge Alberto Martins  
Orientador  
(UTFPR)

---

Prof. Dra.- Katia Valeria M. Cardoso Prates  
(UTFPR)

---

Prof. Dr. - Ricardo Hallak,  
(Universidade de São Paulo)

---

Profa. Dra. Alessandra Furtado da Silva  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que se ocupou em me orientar, fortalecer e ajudar sempre que precisei.

À minha família, por todo o apoio e patrocínio prestado.

Ao meu orientador, Jorge Alberto Martins, que desde o início mostrou muito ânimo e entusiasmo pelo tema do trabalho, me apresentando aquele que foi o assunto abordado aqui. Gratidão ainda pela amizade, pelo companheirismo, bom tratamento, e patrocínios às atividades do mestrado e aos cafés.

À minha co-orientadora, profa. Luciana Furlaneto-Maia, pelo apoio e suporte prestados, pelas correções do trabalho, e todas as críticas construtivas.

À Dra. Alane T. P. Moralez, por todo o suporte e apoio técnico e prático em laboratório de microbiologia.

Agradeço grandemente aos amigos e colegas que colaboraram direta e indiretamente com a execução deste trabalho, em especial àqueles que se dispuseram em períodos alternativos do dia e da noite para as atividades de laboratório e de escrita, particularmente, ao André Montagnini, e aos amigos e futuros mestres Thais Fujita e Anderson Rudke.

Ao Laboratório de Eventos Extremos (EAE), ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMBDA) e LAPAR.

Aos Técnicos das Prefeituras e Secretarias de Agricultura dos municípios de Bom Jesus do Sul, Barracão, Flor da Serra do Sul, Princesa, Dionísio Cerqueira e Guarujá do Sul;

Aos moradores das propriedades onde encontram-se instaladas as placas detectoras de granizo (granizômetros) que gentil e prontamente colaboram com a coleta do material, levando a sério a proposta deste trabalho, a pesquisa e o desenvolvimento científico. Sem essas pessoas seria de fato quase impossível coletar amostras nos diversos locais em que foram coletadas. Agradeço e admiro muito essa postura deles.

À Tina Šantl-Temkiv, por toda hospitalidade na Universidade de Aarhus, compartilhando humildemente de seu trabalho na faculdade, apresentando as instalações físicas, laboratórios e equipamentos, particularmente, a câmara para testes de nucleação de gelo (uma curiosidade sanada). Agradeço, em especial, pela disposição em colaborar com meu trabalho.

Ao Alex Michaud por compartilhar seu entusiasmo pelo estudo do granizo, pela hospitalidade e gentileza em oferecer e compartilhar referências bibliográficas com muita boa-vontade e prontidão.

Ao PPGEA e à UTFPR, pelos recursos providos para a realização deste trabalho.

*“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, com que se sintam humildes.”*

*Leonardo da Vinci*

## RESUMO

A queda de granizo é um fenômeno muito recorrente nas tempestades que atingem a Região Sul do Brasil, região do país que registra a maior incidência do fenômeno. Ainda assim, pouca investigação científica foi conduzida até o momento para se compreender as principais características do fenômeno e os mecanismos nele envolvidos. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo apresentar, pela primeira vez, uma caracterização da composição microbiológica cultivável do granizo de uma tempestade ocorrida no sudoeste do estado do Paraná. Após terem seus diâmetro, massa e volume mensurados fisicamente, amostras de granizo de uma tempestade ocorrida em julho de 2016 foram submetidas a um protocolo de descontaminação estabelecido neste trabalho, e cultivadas em meio MHA para o isolamento de bactérias. As UFC foram caracterizadas e contabilizadas e os 76 isolados representativos obtidos foram submetidos a análise morfotintorial com a técnica coloração de Gram. Um agrupamento fenotípico utilizando o software UPGMA permitiu a seleção de 22 isolados representativos para serem enviados ao sequenciamento genético. O DNA total destes isolados foi extraído por kit comercial e na sequência foi realizada PCR para amplificação da região 16S de RNA ribossômico (RNAr). O amplicon gerado foi encaminhado para sequenciamento em empresa especializada, e as sequências genéticas obtidas foram submetidas a buscas de similaridades com sequências gênicas presentes no GenBank, por meio do BLAST. Como resultado foram identificadas 11 espécies de bactérias pertencentes a 8 gêneros distintos, todas características de ambiente natural, com predominância de espécies em formato de bacilo, Gram-positivas e formadoras de esporos. Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* representaram 50% das espécies identificadas e foram apontados em outros estudos como potenciais nucleadores de gelo. Identificou-se ainda o gênero *Sporosarcina* como o único não encontrado em buscas feitas na literatura para estudos relacionados a amostras de ar, água de nuvem ou granizo. Com relação às propriedades físicas, as pedras de granizo apresentaram diâmetros médios entre 1,15 e 1,75cm, e densidades médias variando entre 0,8 a 1,0g/mL, condizentes com a literatura. Por fim, sugestões para estudos futuros foram apresentadas nas conclusões.

**Palavras-Chave:** Bactérias; Brasil; Granizo; INA; Microrganismos; Nucleador de Gelo; Protocolo de Descontaminação; Paraná.

## ABSTRACT

The hailfall is a recurrent phenomenon in storms that reach Brazil's South Region. Nevertheless, little scientific investigation has been conducted in order to understand the main characteristics and involved mechanisms. Physical, chemical and microbiological characterization of hailstones consists on an important stage to understand processes associated to events that culminate in hail. Thus, this work aims to present, for the first time, a characterization of microbiological composition of hail from a hailstorm occurred in southwestern of Paraná state. Hailstones from a storm occurred in July 2016 were physically characterized (mass, diameter, volume, density), and submitted to a decontamination protocol established in this work. Melt hailstone water was plated to grow in MHA medium for bacteria isolation. We counted and characterized CFU, resulting in 76 representative isolates that were submitted to morphotintorial analysis by Gram stain technique. UPGMA software delivered a phenotypic grouping that enabled the selection of 22 representative isolates to be forwarded to the genetic sequencing service. We extracted total DNA from these isolates by commercial extraction kit and performed a PCR for amplification of ribosomal RNA (rRNA) 16S region. A specialized company provided the genetic sequences to the generated amplicon. The genetic sequences were submitted to BLAST for similarity search in GenBank. As a result, we identified 8 genera and 11 species of environmental bacteria, which were predominantly rod-shaped, Gram-positive, and spore-forming. *Bacillus* and *Paenibacillus* represented 50% of the species identified and they were mentioned in other studies as potential ice nucleators. *Sporosarcina* was the only genus that could not be found in our literature searches regarding air, cloud water or hail samples. Regarding the physical properties, hailstones had average diameters between 1.15 and 1.75cm, and mean densities ranging from 0.8 to 1.0g / mL, consistent with the literature. Finally, we present suggestions for future studies in the conclusion.

**Keywords:** Bacteria; Brazil; Decontamination Protocol; Hail; Ice Nucleation Active (INA) Microorganisms; Paraná.



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

BHI	Brain-Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CFU	Colony Forming Units
DNA	Ácido desoxirribonucléico (desoxiribonucleic acid)
MHA	Müeller-Hinton Agar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RNA	Ácido ribonucléico (ribonucleic acid)
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

- BJ-Ki – Ponto de coleta de amostras no município de Bom Jesus do Sul, “Restaurant Kiosk”
- BJ-06 – Ponto de coleta de amostras no município de Bom Jesus do Sul, nº 06
- BJ-11 – Ponto de coleta de amostras no município de Bom Jesus do Sul nº 11
- BJ-12 – Ponto de coleta de amostras no município de Bom Jesus do Sul nº 12
- BJ-58 – Ponto de coleta de amostras no município de Bom Jesus do Sul nº 58
- BA-Est – Ponto de coleta de amostras no município de Barracão, Rodovia BR-163 Km 06

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
3.1 AEROSSÓIS E MICRORGANISMOS NA ATMOSFERA .....	14
3.2 NUCLEAÇÃO DE GELO NO INTERIOR DE NUVENS.....	15
3.3 BIOAEROSSÓIS E A NUCLEAÇÃO DE GELO NO INTERIOR DE NUVENS.....	17
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>20</b>
4.1 COLETA DE AMOSTRAS .....	20
4.2 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DAS AMOSTRAS DE GRANIZO .....	21
4.2.1 Mensuração de Massa .....	21
4.2.2 Mensuração de Volume.....	22
4.2.3 Medição do Diâmetro.....	22
4.2.4 Densidade .....	22
4.3 PROTOCOLOS PARA DESCONTAMINAÇÃO DO GRANIZO .....	23
4.4 ANÁLISE BIOLÓGICA .....	25
4.4.1 Análise Microbiológica.....	26
4.4.1.1 Isolamento de microrganismos presentes nas pedras de granizo.....	26
4.4.1.2 Identificação morfolotintorial dos grupos microbianos .....	26
4.4.1.3 Seleção de isolados para realização de sequenciamento genético .....	26
4.4.2 ANÁLISE MOLECULAR.....	27
4.4.2.1 Extração de dna total.....	27
4.4.2.2 Amplificação da Região 16S – RNAr.....	27
4.4.2.3 Sequenciamento e análise comparativa de sequências (BLAST).....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>29</b>
5.1 COLETA DE AMOSTRAS .....	29
5.2 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DAS AMOSTRAS DE GRANIZO .....	29
5.3 PROTOCOLO PARA DESCONTAMINAÇÃO DO GRANIZO .....	31
5.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA – CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS ENCONTRADAS NO GRANIZO.....	34
5.5 SELEÇÃO DE ISOLADOS PARA SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	37
5.6 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S – RNAR .....	38
5.7 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE COMPARATIVA DE SEQUÊNCIAS (BLAST) .....	39
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Tempestades acompanhadas de chuva torrencial, vendavais, tornado e granizo representam grande preocupação para a sociedade, em particular pelas enormes perdas econômicas e sociais que causam (JOVEL, 1989; CROMPTON e MCANENEV, 2008; IPCC, 2014). Tempestades intensas são comuns em várias partes do mundo, em especial nas zonas temperadas. As estações do ano bem definidas para esta faixa do planeta, com verões quentes e invernos frios, favorecem a ocorrência dessas tempestades que, muito frequentemente, são acompanhadas de queda de granizo, com pedras de gelo atingindo vários centímetros de diâmetro (HENRI, 2000; CLARK e WEBB, 2013; MARTINS et al., 2016; PUNGE e KUNZ, 2016).

A porção mais ao sul do Brasil encontra-se nessa faixa temperada e tempestades de granizo fazem parte do cotidiano das pessoas que nela habitam. Embora exista um grande número de estudos dedicados às tempestades de granizo, observa-se que o tema é muito pouco estudado para as regiões brasileiras (MARTINS et al., 2016). O granizo é um evento meteorológico de curtíssimo prazo e que pode ocorrer sobre uma área muito limitada, o que torna difícil o avanço do conhecimento sobre o fenômeno (CHANGDON, 1977). Entretanto, os danos sobre plantações, animais, veículos e edifícios podem ser imensos e causar enorme prejuízo financeiro em muitos setores econômicos (JAROSZWESKI et al., 2015). Por esta razão, tem sido uma questão de grande preocupação tanto para a comunidade científica quanto para as companhias de seguros (MUNICH RE, 1999).

O conhecimento das condições do ambiente e da atmosfera é extremamente importante para o avanço na compreensão e previsibilidade das tempestades de granizo. Em regiões do mundo onde houve preocupação em se estudar as características de ocorrência do fenômeno, foram constatados significativos ganhos científicos (como pode ser notado pelas várias referências citadas neste trabalho), bem como redução nos danos sociais e econômicos decorrentes dos eventos. A melhor compreensão do fenômeno permite a antecipação de ações que colaboram com tomadas de decisões, favorecendo, por exemplo, a produção agrícola e pecuária (determinadas produções pecuárias extensivas contam com grandes quantidades de animais em campos abertos). Tais medidas têm possibilitado o avanço na compreensão de aspectos e locais associados à ocorrência de granizo (THIELEN e GADIAN, 1997; SIOUTAS e FLOCAS, 2003; POČAKAL et al., 2009; SIOUTAS et al., 2009; TUOVINEN et al., 2009; CINTINEO et al., 2012; BERTHET et al., 2013), bem como de propriedades inerentes ao

monitoramento por técnicas de sensoriamento remoto (DELOBBE E HOLLEMAN, 2006; BEDKA, 2011; CECIL e BLANKENSHIP, 2012), à previsibilidade (ARAN et al., 2007; LESLIE et al., 2008; PARASCHIVESCU et al., 2011; MERINO et al., 2013; MOHR et al., 2015) e à prevenção (RAKOVEC et al., 1990; MESINGER E MESINGER, 1992; SIMEONOV, 1996; DESSENS, 1998; MALKAROVA, 2011).

Além das condições locais e sinóticas que favorecem à ocorrência de granizo, a investigação das características físicas, químicas e microbiológicas das pedras de gelo consiste em etapa importante para o entendimento dos processos associados à formação das tempestades severas que culminam com a formação de granizo. Alguns estudos têm apontado que certas espécies de microrganismos, principalmente bactérias, atuam como núcleos de condensação de nuvens e, em especial, de gelo (MANDRIOLI et al., 1973; BAUER et al., 2003; SUN E ARIYA, 2006; MÖHLER et al., 2007; ŠANTL-TEMKIV et al., 2013; MICHAUD et al., 2014).

No Brasil a Região Sul é a que registra a maior incidência de tempestades severas com queda de granizo. Dados da Defesa Civil registram com detalhes desastres causados por esses eventos e fornecem informações detalhadas sobre os prejuízos socioeconômicos e ambientais decorrentes (FELIX, 2015). A Região Sul apresenta eventos concentrados principalmente nos meses de setembro e outubro e faixa de horário entre 16h e 18h (FELIX, 2015). Embora os prejuízos estimados pela Defesa Civil superem a casa de algumas centenas de milhões de reais, até recentemente nenhuma investigação científica foi conduzida para que as principais características do fenômeno e os mecanismos envolvidos possam ser revelados.

Dada a baixa atenção que as instituições de fomento têm dado ao tema e considerando sua grande importância para a Região Sul do Brasil, a UTFPR tem apoiado, juntamente com as Secretarias de Agricultura dos municípios da região oeste dos estados do PR e SC, um projeto relacionado à ocorrência de tempestades de granizo na região. Isso tem permitido a instalação e manutenção, com recursos próprios para pesquisa, desde julho de 2014, de uma rede de detecção de granizo na fronteira oeste dos estados do PR e SC. A região foi escolhida por ser aquela onde se observa a manifestação do fenômeno com maior frequência e intensidade e grandes danos à sociedade. Dessa forma, a região de estudo compreende os municípios de Barracão (PR), Bom Jesus do Sul (PR), Flor da Serra do Sul (PR), Dionísio Cerqueira (SC), Guarujá do Sul (SC) e Princesa (SC), que apresentam características de desenvolvimento rural voltadas à agricultura familiar. Metade desses municípios apresenta população rural maior que a urbana, como é o caso de Bom Jesus do Sul (75,42%), Flor da Serra do Sul (65,21%) e Princesa (63,6) (IBGE, 2010).

É no contexto acima descrito que este trabalho (que compõe parte do referido Projeto) se propõe a analisar a composição microbiológica predominante em amostras de granizo com vistas à compreensão do potencial impacto local e remoto das emissões naturais e antropogênicas sobre o desenvolvimento da fase de gelo no interior das células convectivas. O estudo pretende contribuir para expandir as fronteiras do conhecimento no que se refere à compreensão dos processos envolvidos na formação do granizo e de sua ocorrência, mais especificamente, nessa região. O foco principal do trabalho está na análise de amostras coletadas e não pretende encerrar em si a completa dimensão da microbiologia dos granizos, mas ser uma referência pioneira para o assunto na América do Sul.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a composição microbiológica do granizo coletado em um evento específico de chuva na região sudoeste do Paraná, e contribuir com investigações voltadas à compreensão da ocorrência de microrganismos e de sua importância no processo de formação de gelo na atmosfera da região de estudo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo de limpeza das pedras de granizo;
- Caracterizar as propriedades físicas médias de massa, volume, diâmetro e densidade das amostras de granizo;
- Isolar microrganismos presentes nas amostras de granizo;
- Identificar as bactérias presentes nas amostras de granizo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 AEROSSÓIS E MICRORGANISMOS NA ATMOSFERA

A atmosfera terrestre é rica em partículas com origem na superfície do planeta, tanto por conta das emissões naturais quanto por atividades humanas (ANDREAE, 2007). Isso inclui poeira do solo e de áreas desérticas (ALFARO e GOMES, 2001; ARIMOTO, 2001; DEMOTT et al., 2003), material orgânico de emissões biogênicas (KULMALA et al., 2004; BAUER et al., 2003; ARNETH et al., 2008; AMIRO et al., 2009), partículas de incêndios florestais (FLANNIGAN et al., 2000; GENEROSO et al., 2003; ANDREAE et al., 2004; GILLET et al., 2004; HOELZEMANN et al., 2004; ARORA e BOER, 2005), sal marinho (O'DOWD e SMITH, 1993; BIGG e LECK, 2008; LEWIS e SCHWARTZ, 2004; CLARKE et al., 2006; PIERCE e ADAMS, 2006) sulfato de emissões marinhas por fitoplâncton (GABRIC et al., 1993; AYERS et al., 1997; BOYD, 2002; BARNERS et al., 2006; ARCHER, 2007; CARSLAW et al., 2010) e emissões industriais e urbanas (ZHANG e WEXLER, 2004; VOLKAMER et al., 2006; LANZ et al., 2007; WEBER et al., 2007; McMEEKING et al., 2012). Esses aerossóis também têm um efeito significativo sobre componentes do sistema terrestre, como por exemplo, no balanço radiativo atmosférico (HAYWOOD e BOUCHER, 2000; BOUCHER e PHAM, 2002; FEICHTER et al., 2004; LOHMANN e FEICHTER, 2005) no albedo da neve e do gelo (WARREN e WISCOMBE, 1980; KRINNER et al., 2006; FLANNER et al., 2007), na disponibilidade de radiação fotossinteticamente ativa (GU et al., 2002; GU et al., 2003) e no fornecimento de nutrientes aos oceanos (CASSAR et al., 2007; WOODHOUSE et al., 2008). Na maioria dos casos, os mecanismos de retroalimentação do sistema terrestre sobre a concentração de aerossóis estão cercados por grande incerteza (BOPP et al., 2003; BOPP et al., 2004; BRYANT et al., 2007; GOLDSTEIN e GALBALLY, 2007).

Aerossóis de origem biológica, em particular, tem despertado muita atenção da comunidade científica, principalmente pelo seu papel em importantes processos físicos e químicos da atmosfera terrestre (ARIYA e AMYO, 2004). Um quarto das partículas totais em suspensão na atmosfera (aerossóis) apresenta material biológico em parte de sua constituição (JONES e HARRISON, 2004). Essa fração de participação do material orgânico na composição dos aerossóis possui grande variabilidade espacial, de maneira que pode variar de contribuições praticamente nulas sobre determinadas áreas do planeta, onde predominam partículas com origem no solo, como por exemplo os desertos (CHUNG, 1992; GAO et al., 1997; ZHANG et al., 2002; MARCONI et al., 2014), até serem majoritárias sobre determinados biomas, como



por exemplo, as grandes florestas tropicais (ANDREAE e ANDREAE, 1988; ARTAXO e HANSSON, 1995; MIRCEA et al., 2005; DECESARI et al., 2006).

Os microrganismos presentes nos aerossóis também são transportados por longas distâncias e podem ser úteis como bioindicadores da origem do material particulado que é depositado sobre determinada região (DESPRÉS et al., 2012; MEOLA et al., 2015). O clima e as condições meteorológicas também são determinantes na liberação inicial dos bioaerossóis e sua dispersão na atmosfera (JONES e HARRISON, 2004; JAENICKE, 2005; HEALD e SPRACKLEN, 2009). Ao mesmo tempo, a disponibilidade de temperatura e água pode influenciar a liberação de alguns microrganismos, controlando a variação de curto prazo de pólen, esporos fúngicos e concentrações bacterianas (JONES e HARRISON, 2004).

A atividade de nucleação das partículas pode ainda ser influenciada em alguns casos por pré-ativação, efeitos de memória (histerese), Radiação UV e campos elétricos entre outros fatores associados ao ambiente interno à nuvem (ROBERTS e HALLETT, 1968; SCHALLER e FUKUTA, 1979 apud PRUPPACHER e KLETT, 1997). Além disso, ciclos repetidos de congelamento e derretimento no laboratório levam à conclusão de que a maioria das nucleações de gelo é devido a características intrínsecas da partícula e que podem promover congelamento ao longo da mesma temperatura mais de uma vez (ANDERSON e HALLETT, 1976). Portanto, uma vez presentes na atmosfera, os bioaerossóis podem desempenhar papel importante na formação das nuvens e na evolução da estrutura de desenvolvimento das tempestades.

### 3.2 NUCLEAÇÃO DE GELO NO INTERIOR DE NUVENS

Parte significativa das nuvens existentes na atmosfera é formada de gelo. E os aerossóis têm papel importante nesse processo. O gelo pode ser formado na atmosfera a partir da água líquida ou diretamente a partir da fase de vapor, podendo ocorrer por meio de dois processos: nucleação homogênea (HEYMSFIELD e SABIN, 1989; KHVOROSTYANOV e SASSEN, 1998; KOOP et al, 2000) e nucleação heterogênea (DEMOTT et al., 1998; DEMOTT et al., 1999). Vali et al (2015) observam que com o crescente conhecimento científico sobre nucleação heterogênea de gelo nos últimos anos, e a confusão entre terminologias utilizadas na literatura, sugerem definições para os termos utilizados nas descrições do processo de nucleação de gelo, em especial, a nucleação heterogênea.

De acordo com os autores citados no parágrafo anterior, o processo de nucleação homogênea de gelo é aquele que se dá sem a presença de substâncias estranhas/externas participando do processo, podendo ocorrer a partir da água na fase de vapor - por deposição

(vapor supersaturado transforma-se diretamente em gelo), ou a partir da água líquida - por congelamento (corpo líquido super-resfriado)

Devido à alta supersaturação requerida, o processo de **nucleação homogênea por deposição** não é observado na atmosfera ou em sistemas naturais. Contudo, há evidências desse tipo de nucleação envolvendo o passo intermediário de condensação homogênea de líquido, ou uma fase amorfa, em supersaturações abaixo da necessária para que a deposição ocorra (MURRAY e JENSEN, 2010; MÖHLER, 2007). Já o processo de **nucleação homogênea por congelamento** requer temperaturas abaixo de  $-38^{\circ}\text{C}$  para ocorrer (PRUPPACHER e KLETT, 1980; SASSEN e BENSON, 2000; KÄRCHER e LOHMANN, 2002).

A nucleação heterogênea de gelo, por sua vez, ocorre com a presença de uma substância externa, acontecendo num estado de menor supersaturação ou super-resfriamento que o exigido para a nucleação homogênea. A substância externa em questão pode ser uma partícula, uma molécula ou uma entidade - objeto, material, substância ou outra coisa - que seja o agente responsável por tal processo (VALI et al, 2015). De acordo com a maneira com que partícula está envolvida, identificam-se duas classificações de nucleação heterogênea: i) por deposição e ii) por congelamento.

A nucleação heterogênea por deposição é definida como a nucleação de gelo que se dá a partir de vapor supersaturado sobre uma partícula nucleadora de gelo (IN) ou equivalente, sem a formação de líquido (VALI et al, 2015). Os autores afirmam ainda que é difícil a verificação da não formação de líquido nesse processo, e que, assim como na nucleação homogênea por deposição, um estágio transitório com a presença de líquido pode acontecer, mas que não chega a se desenvolver a um nível macroscópico e observável. Por fim, observam que ainda é necessário conhecer mais a respeito dos detalhes do processo.

A nucleação heterogênea por congelamento ocorre a partir do congelamento da água líquida super-resfriada, porém, sendo o processo atribuído a um IN ou equivalente. De acordo com a forma com que o IN está envolvido nesse processo, ele pode ainda ser classificado em congelamento por imersão (quando o IN está imerso no líquido) e por contato (quando há o contato da partícula com a superfície do líquido, a partir do ar) (LOHMANN, 2002). Existem ainda outros modos de congelamento relatados na literatura, como por exemplo, congelamento por eletricidade, evaporação, choque mecânico e colisão (VALI et al, 2015).

### 3.3 BIOAEROSSÓIS E A NUCLEAÇÃO DE GELO NO INTERIOR DE NUVENS

No contexto deste trabalho, o papel mais importante associado aos bioaerossóis está no seu papel como formador de núcleos de condensação de nuvens (CCN, do inglês Cloud Condensation Nuclei) e núcleos de gelo (IN, do inglês Ice Nuclei) (DIEHL et al., 2001; MÖHLER et al., 2007; PÖSCHL et al., 2010; MORRIS et al., 2014). Durante muito tempo se assumiu que somente partículas inorgânicas, tais como partículas minerais, originárias de regiões áridas e desérticas, fossem responsáveis pela nucleação de gelo na atmosfera (BAUER et al., 2003). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que microrganismos em suspensão na atmosfera são importantes precursores de CCN e IN (CHRISTNER et al., 2008a, 2008b; ARIYA et al., 2009; DEMOTT e PRENNI, 2010; JOLY et al., 2013). Em geral tais microrganismos são encontrados na forma de estruturas dormentes denominadas de esporos, que conferem certa vantagem genética ao permitir que sobrevivam durante o transporte e por períodos prolongados de estresse ambiental. Estes esporos, de acordo com sua localização na célula em seu processo de formação, podem ser considerados endósporos ou exósporos.

A presença de microrganismos no interior de granizos, em particular, remonta ao final do século XIX, conforme pode ser observado nas discussões apresentadas por HARRISON (1898). Entretanto, a presença de bactérias no interior dos granizos foi sugerida na época apenas como decorrente do transporte de água para dentro da nuvem, por ocasião de formação da tempestade, e subseqüentemente congelamento. Em décadas mais recentes, a presença de microrganismos no interior de granizos tem chamado a atenção (MANDRIOLI et al., 1973; ŠANTL-TEMKIV et al., 2012; ŠANTL-TEMKIV et al., 2013). Partículas biológicas isoladas a partir de amostras de granizo, por exemplo, têm se comportado como núcleos de gelo ativos em temperaturas na faixa de  $-2^{\circ}\text{C}$  a  $-18^{\circ}\text{C}$  (MICHAUD et al., 2014), o que pode ser considerado como uma faixa de temperatura relativamente alta para os padrões de nucleação de gelo no interior de nuvens na atmosfera (SHEN et al., 1977; ZIMMERMANN et al., 2008; ATKINSON et al., 2013; PINTI et al., 2012)

O estudo realizado por MÖHLER et al. (2007) é particularmente importante porque revela que bactérias identificadas no interior dos granizos, especialmente as bactérias gram-negativas, têm papel fundamental na formação de cristais de gelo no interior de nuvens. O estudo de ŠANTL-TEMKIV et al. (2013), por exemplo, constata a presença de vários gêneros bacterianos em amostras de granizo coletadas logo após a queda, e verifica que a origem da maior parte desses gêneros são habitats terrestres, em especial, as plantas, ou a filosfera.

### 3.4 CARACTERÍSTICAS DE BIOAEROSSÓIS NUCLEADORES DE GELO

As características dos bioaerossóis que os tornam IN em temperaturas mais elevadas que os demais aerossóis ainda não são bem compreendidas. Alguns tratamentos teóricos apontam para uma associação entre o tamanho da partícula nucleadora, a supersaturação e a temperatura (PRUPPACHER e KLETT, 1997; EASTWOOD et al., 2008). Além dessas relações, tanto a teoria quanto as observações indicam que as superfícies de nucleação provavelmente possuem arranjos cristalográficos que se assemelham aos arranjos das moléculas da água. O iodeto de prata, que tem sido amplamente usado nos processos de supressão de granizo (BIGG e TURTON, 1986; BALASCH et al., 2004; DESSENS et al., 2016), por exemplo, é uma das substâncias que confirmam esse fato. Também há evidências na literatura de que a pré-ativação, lacunas, cavidades, ângulo de contato e outras características superficiais de materiais cristalinos podem aumentar o potencial de nucleação da partícula (MASON e MAYBANK, 1958; ROBERTS e HALLETT, 1968; EASTWOOD et al., 2008)

Em relação aos tipos de microrganismos presentes na atmosfera, DELEON-RODRIGUEZ et al. (2013) identificaram mais de 300 espécies de bactérias em amostras de ar coletadas entre 8 e 15 km de altitude em diferentes regiões. Nesse estudo as bactérias representaram, em média, cerca de 20% do total de partículas no domínio entre 0,25 a 1,0 µm, sendo pelo menos uma ordem de grandeza maior do que a concentração de fungos. A maior parte das bactérias identificadas na atmosfera correspondeu a patógenos de plantas. Aerossóis e amostras de ar coletados em um sítio remoto da Áustria também foram utilizados para a identificação da presença de bactérias por BAUER et al (2003), que identificou tanto espécies Gram positivas como Gram negativas, porém, nenhuma conhecida da literatura como espécie apta para nucleação de gelo.

Deve ser considerado que, para as bactérias, o fato de existirem e serem transportadas como aerossóis na atmosfera representa um mecanismo positivo para sua dispersão biológica. Permeando o solo e as nuvens por meio desses processos/ciclos, as bactérias são capazes de efetivamente transitar por diferentes ecossistemas e isso pode significar um impacto no transporte de longa distância e distribuição global de diferentes espécies de bactérias.

O trabalho pioneiro de Vali et al. (1976) sugere que a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas syringae* seja um dos mais eficientes nucleadores de gelo na atmosfera, podendo ser ativada em temperaturas de até -2 °C. A partir da descoberta de Vali, estudos têm identificado outras bactérias nucleadores de gelo, em particular aquelas pertencentes a três gêneros de espécies Gram-negativas *Pseudomonas*, *Xantomonas* e *Erwinia* (LINDOW, 1983;

ROGERS et al., 1987; FALL e FALL, 1998; BAUER et al, 2003; MORRIS et al., 2004; JOLY et al., 2013; ŠANTL-TEMKIV et al., 2012; ŠANTL-TEMKIV et al., 2013). Alguns estudos têm sugerido que a propriedade nucleadora de gelo dessas bactérias esteja relacionada à existência de um gene específico que codifica proteínas ancoradas na membrana superficial das bactérias, capazes de acelerar a formação de cristais de gelo em água super-resfriada a temperaturas de  $-2^{\circ}\text{C}$  a  $-10^{\circ}\text{C}$  (WOLBER, 1986 e TURNER et al., 1991 apud SARHAN, 2011).

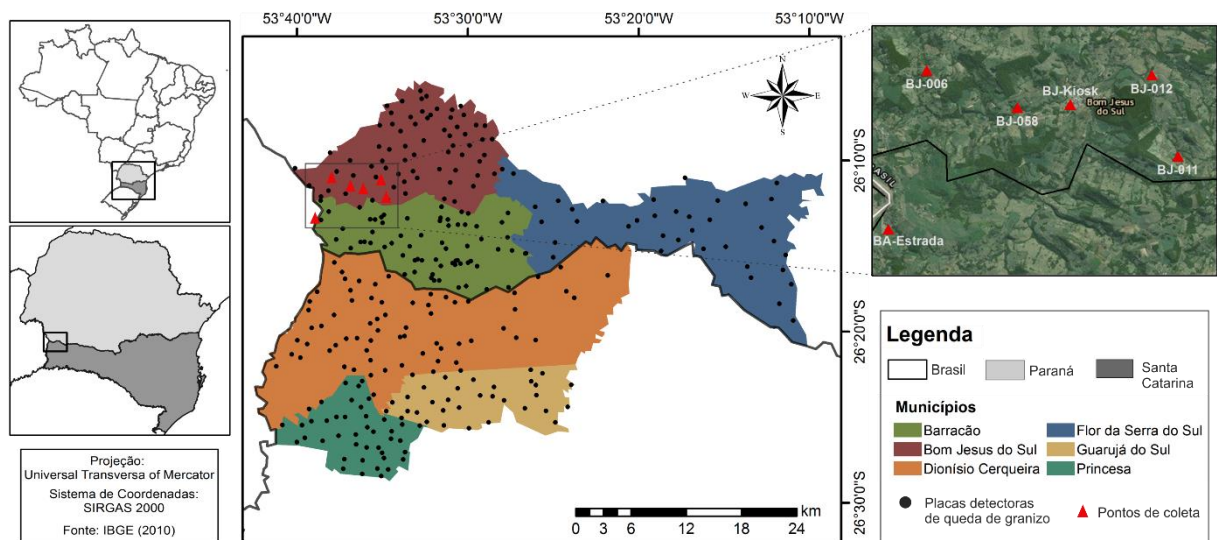
Outro aspecto relevante a ser analisado é a fonte dos microrganismos em suspensão na atmosfera, em particular bactérias. Lindow et al. (1978), por exemplo, analisaram diversos tipos de vegetação (anuais, herbáceas perenes, angiospermas amadeiradas e coníferas) nos estados de Califórnia, Colorado, Florida, Louisiana, e Wisconsin, nos Estados Unidos, e observaram que 74 das 95 espécies de bactérias analisadas foram consideradas nucleadoras de gelo. Observaram ainda a prevalência desse tipo de bactéria (nucleadora de gelo) em todos os grupos vegetais analisados, com exceção do grupo das coníferas. Todas as bactérias nucleadoras de gelo assemelharam-se a *Pseudomonas syringae* ou *Erwinia herbicola*, sugerindo que as superfícies das plantas podem constituir uma fonte significativa de IN.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA DE AMOSTRAS

As pedras de granizo utilizadas neste trabalho são provenientes de um evento de precipitação ocorrido em 14 de julho de 2016, entre 20:30h e 22h, nos municípios de Bom Jesus do Sul e Barracão, no Paraná. Os pontos de coleta das amostras no município de Bom Jesus do Sul foram denominados **BJ-06**, **BJ-11**; **BJ-12**; **BJ-58**; **BJ-Ki** e, no município de Barracão, **BA-Est**.

As localizações dos pontos de coleta das amostras são apresentadas como triângulos vermelhos na **Figura 01**, e suas coordenadas são: **BJ-06** (26° 11' 10.23" S; 53° 37' 58.69" W); **BJ-11** (26° 12' 17.78" S; 53° 34' 41.38" W); **BJ-12** (26° 11' 13.93" S; 53° 35' 2.03" W); **BJ-58** (26° 11' 39.54" S; 53° 36' 47.70" W); **BJ-Ki** (26° 11' 37.00" S; 53° 36' 6.00" W) e **BA-Est** (rodovia BR-163 km 06, 26° 13' 15.00" S; 53° 38' 29.00" W).



**Figura 01.** A imagem central apresenta os seis municípios participantes Projeto Granizo (nomes na legenda), a localização dos pontos onde encontram-se instaladas placas para detecção de queda de granizo (pontos negros), e a localização dos **pontos onde foram coletadas as amostras de granizo (identificados com triângulos vermelhos), no evento de chuva de 14 de julho de 2016**. A imagem no canto superior direito é uma imagem de satélite que mostra, com maior aproximação e riqueza de detalhes de superfície, a localização desses pontos (triângulos vermelhos com os respectivos nomes). As duas figuras à direita (em escala de cinza) mostram a situação geográfica da região de estudo.

A coleta do granizo foi realizada em recipientes plásticos estéreis de Polietileno de Alta Densidade (PEAD) com tampa, e enxaguados com Tween 20 (surfactante) a 1% para evitar adesão microbiana. Os frascos foram distribuídos aos moradores das propriedades, instruídos

em coletar o granizo o mais brevemente possível após a queda, sem efetuar qualquer intervenção, e encaminhadas diretamente ao freezer. Também foi orientada a anotação de data e horário da chuva. Num período não superior a 24h os recipientes contendo granizo foram armazenados em caixas isotérmicas preenchidas com gelo e enviados ao laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada da UTFPR – Campus Londrina.

Para a realização das análises, físicas e microbiológicas, cada ponto de coleta de granizo foi considerado uma amostra individual.

## 4.2 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DAS AMOSTRAS DE GRANIZO

A caracterização física das amostras de granizo consistiu na constatação das médias aritméticas (Equação 1) das grandezas massa, volume, diâmetro e densidade de amostras estatísticas pertencentes a cada ponto de coleta de granizo. Para tanto, utilizaram-se 10 pedras de granizo obtidas aleatoriamente dos frascos que continham as pedras proveniente dos diferentes pontos de coleta em campo. O critério para a utilização de 10 pedras como amostra representativa foi amostragem por conveniência, já que o número de pedras de granizo disponíveis provenientes de cada localidade foi limitado, sendo de interesse do grupo de pesquisas conservar indivíduos dessas amostras para análises futuras.

:

$$X \text{ médio} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1)$$

onde X é a propriedade mensurada (massa/volume/diâmetro); o numerador representa o somatório dos valores individuais ( $x_i$ ) obtidos a partir das pedras de granizo mensuradas e  $n$  indica o número total de pedras mensuradas.

O procedimento ocorreu em ambiente refrigerado (-20°C) para evitar a perda de material por derretimento durante o manuseio das pedras.

### 4.2.1 Mensuração de Massa

A medição da massa foi realizada em balança analítica, com o auxílio de placas de Petri e os valores indicados foram registrados individualmente.

#### 4.2.2 Mensuração de Volume

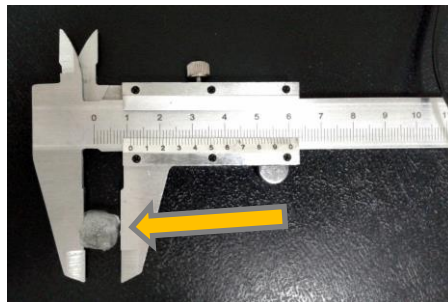
Para a determinação do volume médio das pedras de granizo, as pedras provenientes de cada ponto amostral foram brevemente imersas em proveta preenchida com água destilada resfriada a aproximadamente 4°C, sendo registrada a alteração de volume na proveta. A água da proveta foi previamente resfriada a fim de prevenir a perda de volume por derretimento (ŠANTL-TEMKIV et al., 2012). O volume de cada pedra foi registrado em mililitro e calculado conforme a seguinte equação:

$$v = vf - vi \quad (2)$$

onde  $v$  é o volume da pedra de granizo,  $vi$  é o volume inicial de água na proveta e  $vf$  é o volume final marcado na proveta.

#### 4.2.3 Medição do Diâmetro

Para calcular o diâmetro das pedras de granizo as suas dimensões foram mensuradas nos três eixos (altura, largura e comprimento) com o auxílio de um paquímetro (Dexter) e calculou-se a média aritmética dessas medidas para cada pedra.



**Figura 02.** Medição do diâmetro das pedras de granizo (seta).

#### 4.2.4 Densidade

A densidade das pedras de granizo foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$D = \frac{m}{v} \quad (3)$$



onde  $D$  é a densidade da pedra de granizo,  $m$  é a massa e  $v$  é o volume.

### 4.3 PROTOCOLOS PARA DESCONTAMINAÇÃO DO GRANIZO

Considerando que as amostras de granizo chegariam ao laboratório contaminadas com solo e outras sujidades possivelmente adquiridas no solo e durante o processo de coleta e armazenamento, fez-se necessário definir um protocolo para a limpeza/descontaminação das amostras.

Neste trabalho optou-se por avaliar quatro diferentes protocolos, tendo-se, por fim, adotado aquele que apresentou melhor desempenho. Os procedimentos que verificassem o menor número de colônias bacterianas formadas indicariam os melhores desempenhos. Os quatro protocolos de limpeza testados são descritos a seguir.

- a) Protocolo 1 - Limpeza com água deionizada estéril;
- b) Protocolo 2 - Limpeza com Etanol 60%
- c) Protocolo 3 - Limpeza com HCL 0,01N
- d) Protocolo 4 - Limpeza com Peróxido de Hidrogênio 3%

Para os testes foram utilizados blocos de gelo confeccionados em laboratório (no lugar de pedras de granizo) e a sua queda foi simulada. Blocos de gelo com aproximadamente 15mL foram obtidos a partir de água destilada estéril dispensada em fôrmas de gelo de base retangular (4cm x 3cm), e armazenados em freezer por no mínimo 24h. Transcorrido esse período, os blocos de gelo foram impactados contra o solo contendo grama e terra, onde permaneceram por determinado intervalo de tempo, a fim de se reproduzir as condições reais da queda do granizo.

Exclusivamente no Protocolo 1 os blocos de gelo permaneceram expostos sobre o solo por três diferentes intervalos de tempo: 5, 10 e 15 minutos, para verificação de possíveis interferências causadas pelos diferentes tempos de exposição às condições ambientes. Não tendo sido verificada influência significativa relacionada a esse fator, os demais protocolos utilizaram apenas blocos de gelo que permaneceram 10 minutos sobre o solo.

Após a permanência no solo, os blocos foram coletados em recipientes de PEAD e levados ao freezer, onde permaneceram à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos protocolos de descontaminação. Blocos de gelo sem simulação de queda e permanência sobre o solo foram utilizados como controles negativos, e todos os protocolos foram realizados em duplicata.

Em todos protocolos testados, a primeira etapa foi a remoção da sujidade visível dos blocos de gelo, por meio de enxágues sucessivos com água deionizada estéril. Nesta etapa o volume de água utilizado não foi mensurado, pois variou conforme o estado de sujidade de cada bloco de gelo:

**a) Protocolo 1 - Limpeza com água deionizada estéril;**

Os blocos de gelo foram submetidos a sucessivos enxágues com água deionizada estéril, para remoção da sujidade visível; verificada essa condição, mais um enxágue com água deionizada estéril reforçou a descontaminação. Para cada um dos intervalos de tempo testados (5, 10 e 15 minutos de permanência dos blocos de gelo sobre o solo) foram utilizados 4 blocos de gelo.

**b) Protocolo 2 - Limpeza com Etanol 60%**

Cinco blocos de gelo foram submetidos a sucessivos enxágues com água deionizada estéril, para remoção da sujidade visível; seguiu-se um enxágue com 40mL de solução estéril de etanol 60%, e finalizou-se o processo com um último enxágue com 100mL de água deionizada estéril, para retirada do etanol.

**c) Protocolo 3 - Limpeza com HCL 0,01N**

Cinco blocos de gelo foram submetidos à limpeza com sucessivos enxágues com água deionizada estéril para remoção da sujidade visível; na sequência, procedeu-se um enxágue com 40mL de HCL 0,01N; finalizou-se o processo com um último enxágue com 100mL de água deionizada estéril, para retirada do ácido.

**d) Protocolo 4 - Limpeza com Peróxido de Hidrogênio 3%**

Cinco blocos de gelo foram submetidos à limpeza com sucessivos enxágues de água deionizada estéril para remoção da sujidade visível, seguidos de um enxágue com aproximadamente 15 mL de solução comercial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%; finalizou-se o processo com um último enxágue com 50mL de água deionizada estéril para retirada da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Observou-se que no Protocolo 4 o mesmo volume de sanitizante utilizado nos outros protocolos (40mL) provocou visível derretimento do primeiro bloco de gelo processado; por esta razão optou-se por adotar volumes próximos de 15mL (ao invés dos 40mL) para a descontaminação dos blocos, procurando-se evitar a perda de material da amostra.

Após cada procedimento de descontaminação, os blocos de gelo foram depositados em placas de Petri estéreis, permanecendo à temperatura ambiente, em condições assépticas, para o descongelamento. Para avaliar a ação descontaminante de cada protocolo, uma alíquota de 50µL dos blocos de gelo derretido foi inoculada por espalhamento na superfície dos meios de cultura solidificados Mueller-Hinton (MHA - KASVI) (Protocolo 1), e Brain-Heart-Infusion (BHI - Acumedia) (Protocolos 2,3 e 4). As placas de todos os protocolos foram incubadas a 28°C por 144 horas. Após 24h e após 144h de cultivo as colônias cultivadas foram quantificadas.

A eficácia de cada protocolo de descontaminação foi avaliada com base no número de colônias formadas após aplicação de cada procedimento proposto. Nesse sentido, foram quantificadas as unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas nas placas de cultivo, e identificou-se o procedimento que apresentou menor número de UFC.

#### 4.4 ANÁLISE BIOLÓGICA

Nesta etapa foram realizados procedimentos de análises microbiológica e molecular a fim de recuperar e analisar as bactérias cultiváveis presentes nas amostras de granizo.

Vale ressaltar aqui um dos aspectos primordiais considerado neste trabalho. Para tanto, é necessário observar que diferentes são as técnicas disponíveis para verificação da presença e identificação de microrganismos em materiais e superfícies. Alguns métodos são capazes de contar e identificar microrganismos com base nas estruturas celulares e no material genético presentes na amostra, independentemente das células estarem vivas ou não. Outros métodos, mais comumente utilizados, são aqueles dependentes do cultivo biológico das células, com a possibilidade de apreensão de dados e informações somente após a reprodução dos organismos. Uma observação importante a ser feita é o fato de que cada técnica apresenta suas limitações. Neste trabalho utilizou-se a técnica de cultivo da amostra, o que obviamente implica na apreensão de informações provenientes apenas dos microrganismos que sobreviveram até a fase final do cultivo bacteriano. Dessa forma, vale ressaltar que nas amostras de granizo analisadas é provável que outros organismos estivessem presentes, no entanto não foram recuperados. A viabilidade de cultivo dos microrganismos depende das particularidades de cada espécie ou indivíduo, de modo que apenas os microrganismos viáveis para cultivo foram objeto do presente estudo.

#### 4.4.1 Análise Microbiológica

##### 4.4.1.1 Isolamento de Microrganismos Presentes nas Pedras de Granizo

Cinco pedras provenientes de cada ponto de coleta foram descontaminadas seguindo o Protocolo 3 de limpeza e depositadas (as cinco juntas) em placas de Petri estéreis, à temperatura ambiente e em condições assépticas, para o descongelamento. Uma alíquota de 100µL foi inoculada por espalhamento em placas com o meio Mueller-Hinton ágar (MHA) para o cultivo e isolamento de bactérias. Esse cultivo foi feito em triplicata e as placas foram incubadas a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  em condições aeróbicas, por 5 dias.

Após a incubação as colônias formadas foram contadas e caracterizadas de acordo com a cor, forma, relevo, tamanho, e tipo de borda. Alíquotas de colônias representativas foram armazenadas em estoque de glicerol 10% e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 4.4.1.2 Identificação Morfotintorial dos Grupos Microbianos

As bactérias isoladas foram submetidas à técnica de coloração de Gram (BISEN P. S., 2014). A reação morfotintorial e a presença de esporos celular foi observada em microscópio óptico comum (Coleman). Para confirmar a presença de esporos visualizados nas lâminas utilizadas na coloração de Gram, foi implementada a técnica de coloração com verde malaquita (HUSSEY E ZAYAITZ, 2007).

##### 4.4.1.3 Seleção de isolados para realização de sequenciamento genético

Tendo em vista a grande quantidade de isolados identificados a partir do cultivo de amostras das pedras de granizo, e levando-se em consideração que muitos foram classificados a partir apenas de análises visuais, podendo, portanto, convergir em espécies geneticamente idênticas, procedeu-se à aplicação de um algoritmo para redução do número de isolados. Este algoritmo utiliza um método de agrupamentos hierárquicos baseados em média aritmética. A partir de uma matriz de distâncias, gerada com base nas informações das características dos diversos isolados, o programa gera um dendrograma.

Para isso, construiu-se uma tabela de dados binários a partir das características de cor, forma, relevo, tamanho, tipo de borda, das colônias observadas, bem como das características de morfologia, Gram e presença de esporos de todos os isolados (**Apêndice 1**). Essa tabela

binária foi então inserida no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, disponível em <http://genomes.urv.es/UPGMA/>), utilizando-se o coeficiente de Jaccard. Com base no dendrograma resultante, considerou-se os diferentes agrupamentos e as distâncias entre os isolados para se selecionar isolados representantes dos diversos grupos, que seguiriam para a etapa do sequenciamento genético.

#### 4.4.2 Análise Molecular

##### 4.4.2.1 Extração de DNA Total

Após a identificação morfotintorial, a extração de DNA total dos isolados microbianos selecionados foi realizada utilizando-se o Kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System – Promega, conforme manual de instruções do fabricante. Para tanto, cada isolado foi cultivado em 3mL de Mueller-Hinton caldo (MHB) e incubado a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$ . As células foram concentradas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas 2 vezes, por centrifugação, com tampão TE (Tris-HCl 1M, pH8; EDTA 0,5M, pH8), a 10.000 rpm por 5 e 10 minutos nas mesmas condições citadas, e submetidas à extração de DNA. Alíquotas dos DNA obtidos foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 4.4.2.2 Amplificação da Região 16S – RNAr

Os isolados microbianos foram identificados a partir da análise da região intergênica do RNA ribossomal denominada 16S. A amplificação dessa região do RNA foi realizada por PCR (Polymerase Chain Reaction) ou reação em cadeia da polimerase, em termociclador (SimpliAmp™ - Life Technologies) num volume de 20 $\mu\text{l}$ , contendo 10ng de DNA complementar, 0,2 mM de cada oligonucleotídeo iniciador (27f - 5'-AGAGTTTGATCC-TGGCTCAG-3'; 1492r - 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (AMATO et al., 2005 e ŠANTL-TEMKIV et al., 2012), 0,2mM de dinucleotídeo trifosfato, 2,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2,5U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 1x de tampão de amplificação. As amplificações foram realizadas com desnaturação inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$  para desnaturação, com anelamento a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, tempo de extensão de 1 minuto a  $72^{\circ}\text{C}$ , e extensão final de 7 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ .

Os produtos da reação de amplificação foram detectados utilizando eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (Tris- Borato EDTA) (SAMBROOK; FRITSCH;

MANIATIS, 1989), e a corrida eletroforética foi realizada a 36V durante duas horas, utilizando o marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi corado com solução de brometo de etídio 0,5µg/ml durante 15 minutos, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (L-PIX - Loccus Biotecnologia) e fotografado em fotodocumentador (UVTrans).

#### 4.4.2.3 Sequenciamento e Análise Comparativa de Sequências (BLAST)

Os produtos de amplificação foram enviados ao serviço de sequenciamento da ACTGene (Ludwig Biotec) de Alvorada-RS, para a realização do sequenciamento, em que foi utilizado o oligonucleotídeo f27. O DNA para envio foi preparado segundo instruções da ACTGene.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados (GenBank) do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia dos Estados Unidos (NCBI) através do algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), buscando similaridades com as depositadas no GenBank. Foram utilizadas as versões MegaBlast e Blastn para a busca de similaridades entre organismos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 COLETA DE AMOSTRAS

A coleta das amostras ocorreu imediatamente após a queda das pedras de granizo, que foram recolhidas diretamente do solo, procedimento similar ao dos trabalhos de Šantl-Temkiv et al. (2012), Šantl-Temkiv et al. (2013) e Michaud et al. (2014). A amostra de granizo do ponto **BA-Est** foi coletada pela própria equipe de pesquisa da UTPFR, que estava presente no município de Barracão no dia da ocorrência da tempestade (**Figura 3**). As outras amostras foram coletadas pelos moradores da região.



**Figura 03.** Granizo da tempestade de 14/julho/16 coletado no ponto **BA-Est**, na beira da Rodovia BR-163 Km 06, onde as pedras encontravam-se acumuladas - detalhe para o frasco de acondicionamento das pedras (seta).

### 5.2 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DAS AMOSTRAS DE GRANIZO

Os valores médios de massa, volume, diâmetro e densidade das pedras de granizo são apresentadas na Tabela 01, de acordo com os pontos de coleta. Para o ponto BJ-12 essas mensurações não foram realizadas, uma vez que a amostra deste ponto consistiu em apenas 6 pedras que apresentaram perda parcial por derretimento, tendo sido suficientes somente para utilização nas análises biológicas.

**Tabela 01** – Valores médios das propriedades físicas das pedras de granizo, obtidos a partir de mensurações.

Ponto	Diâmetro méd. (cm)	Massa méd. (g)	Volume méd. (mL)	Densidade méd. (g/mL)
BJ.Ki	1,15	0,93	1,2	0,9
BA.Est	1,75	2,84	3,1	1,0
BJ.06	1,59	2,20	2,6	0,9
BJ.11	1,36	1,32	1,6	0,8
BJ.58	1,53	1,83	2,0	1,0
<b>Média</b>	<b>1,48</b>	<b>1,82</b>	<b>2,1</b>	<b>0,92</b>

As amostras apresentaram massa média de 1,82g/pedra e volume médio de 2,1mL/pedra. No estudo de Šantl-Temkiv et al. (2012) as 24 pedras analisadas química e microbiologicamente foram maiores e apresentaram massa média de 17,6g/pedra e volume médio de 20,71mL/pedra.

As pedras de granizo não apresentaram grande variação de tamanho em relação aos diferentes pontos de coleta, e os diâmetros médios variaram de 1,15 a 1,75cm.

De acordo com AMS (2012) considera-se granizo partículas de gelo com diâmetro de igual e ou maior que 5mm, enquanto partículas menores que 5mm são consideradas graupel (pellets de neve) e pellets de gelo.

Por não configurarem esferas perfeitas, as pedras de granizo tiveram suas mensurações feitas em três eixos (altura, largura e comprimento) para o cálculo da média aritmética do diâmetro. Assim como neste trabalho, Rosinski et al. (1979) também mensuraram o tamanho das pedras como forma adicional de caracterização das amostras, quando investigavam a presença de partículas insolúveis em embriões de 167 amostras de granizo provenientes de tempestades de diferentes localidades. Em seu estudo, entretanto, as dimensões foram apresentadas a partir de duas medidas em cm, e seus valores denotaram pedras maiores (1,2cm-6,6cm por 1,7cm-6,5cm) que as deste trabalho. As pedras de granizo podem assumir formas circulares e elípticas e estão relacionadas à microfísica de sua formação e crescimento (WANG, 2013). Para o autor citado mesmo que as pedras sejam pequenas, a média aritmética do diâmetro ainda pode ser aplicada para a determinação de seu formato.

A densidade média das pedras de granizos variou entre 0,8 e 1,0g/cm<sup>3</sup>, corroborando com os intervalos de medidas de densidade relatados em literatura, que apresenta variação de



0,04 (presença de ar e interferentes) até densidades próximas daquela do gelo puro ( $0,917 \text{ g.cm}^{-3}$ ) (NAKAYA e TERADA, 1935; LUDLAM, 1952; VITTORI e DI CAPORIACCO, 1959; MACKLIN, STRAUCH e LUDLAM, 1960, apud BROWNING, LUDLAM e MACKLIN 1962). Para Wang (2013) a densidade do granizo pode variar de 0,7 a  $0,9 \text{ g.cm}^{-3}$ ; Braham (1963), citado por Knight e Heymsfield (1983), por sua vez, relatou faixa de densidade com picos em  $0,87 - 0,89 \text{ g/cm}^{-3}$ .

A divergência de densidade deve-se à presença de ar aprisionado por gotículas de água que congelam em seu interior, fazendo com que as pedras com mais bolhas de ar sejam menos densas. Estas, devido à presença das bolhas de ar também apresentam aparência mais opaca, enquanto as pedras mais densas apresentam-se transparentes e límpidas (BROWNING, 1963). Segundo AMS (2012) essas camadas de gelo contendo muitas bolhas de ar alternando com camadas de gelo relativamente claro provavelmente correspondem aos chamados crescimento seco e crescimento úmido.

### 5.3 PROTOCOLO PARA DESCONTAMINAÇÃO DO GRANIZO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados dos Protocolos de descontaminação testados neste trabalho, com a identificação do Protocolo que apresentou a melhor eficácia. Essa eficácia foi avaliada com base no número de colônias bacterianas formadas após a aplicação dos procedimentos de descontaminação. Dessa forma, as médias aritméticas de UFC, contabilizadas após 24h e 144h de cultivo, estão apresentadas na **Tabela 02** (Protocolo 1) e na **Tabela 03** (Protocolos 2, 3 e 4).

**Tabela 02** – Valor médio de UFC mL<sup>-1</sup> após realização do Protocolo de descontaminação 1\*, em meio de cultivo MHA, verificadas após 24h e 144h de cultivo.

Blocos (15mL)	24h	144h
B-cont (3banhos)	P.C.	P.C.
B-5 (3 banhos)	0	10
B-10 (3 banhos)	0	100
B-15 (3 banhos)	0	20

**Notas:** P.C. - presença de colônias (não contabilizadas); B-cont - amostra controle (não foi simulada a queda destes blocos de gelo); B-5/B-10/B-15 - blocos de gelo que permaneceram 5/10/15 min, respectivamente, sobre o solo na simulação da queda.  
\* Os testes de cultivo para cada tempo de exposição foram realizados em duplicata (n=2).

Os resultados apresentados na **Tabela 02** sugerem que, em relação à eficiência do processo de limpeza, não há diferença entre os três distintos intervalos de tempo em que os blocos permaneceram sobre o solo no Protocolo 1. Por exemplo, observa-se que cresceram cinco vezes mais colônias nas amostras dos blocos de gelo que permaneceram 10 minutos sobre o solo, do que nas amostras dos blocos que permaneceram 15 minutos no mesmo local. Em tese, por permanecer um maior tempo de exposição em contato com o solo, em relação aos demais, os blocos BP-15 poderiam apresentar maior contaminação que os outros. Todavia, outros processos físico-químicos inerentes à camada superficial do gelo, por exemplo as mudanças de fase, também poderiam estar ocorrendo simultaneamente e criando condições para contrabalancear o potencial fluxo de microrganismos na direção dos blocos de gelo. Dessa forma, entendeu-se que o tempo de permanência sobre o solo não seria uma variável a ser considerada no restante dos protocolos de descontaminação a serem testados, de modo que neles utilizou-se apenas o tempo de 10 minutos para permanência dos blocos de gelo sobre o solo.

Os resultados dos procedimentos de descontaminação dos blocos de gelo realizados pelos protocolos 2, 3 e 4 são apresentados na **Tabela 03**.

**Tabela 03** - Valor médio de UFC mL<sup>-1</sup> após realização dos Protocolos de descontaminação 2\* (Etanol 60%), 3\* (HCl 0,01N) e 4\* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em meio BHI, verificadas após 24h e 144h de cultivo.

Blocos de gelo (B) (15mL)	Protocolo 2		Protocolo 3		Protocolo 4	
	24h	144h	24h	144h	24h	144h
B-Cont	0	0	0	0	6	94
B1	10	10	0	10	0	0
B2	70	160	0	0	10	10
B3	20	40	0	0	0	10
B4	20	20	0	0	0	0

**Notas:** B-Cont - Amostra controle (não foi simulada a queda deste bloco de gelo); B1 a B4 - Quatro blocos de gelo individuais - Repetição dos testes com indivíduos diferentes. \* Os testes foram realizados em duplicata.

Existem poucos estudos envolvendo análise de gelo e que, portanto, ofereçam descrição sobre os procedimentos de descontaminação. O protocolo de descontaminação seguido por Šantl-Temkiv et al. (2012), por exemplo, consistiu em enxaguar as pedras de granizo por três vezes com uma solução com 1% de cloreto de benzalcônio (cloreto de alquil dimetil benzil amônio) e 62% de etanol em água deionizada, seguido por um enxágue final com água deionizada estéril. No caso de Michaud et al. (2014), para uma das amostras o procedimento consistiu em raspar inicialmente a camada externa das pedras de granizo com uma lâmina de barbear estéril, enxaguar as mesmas com etanol a 95%, seguido de um enxágue final com água deionizada estéril (MilliQ, resistividade de 18,2 MΩ.cm). Este processo removeu cerca de 13% da massa total do granizo, e foi o mesmo protocolo recomendado por Christner et al. (2005). Em uma segunda amostra, devido ao pequeno tamanho das pedras de gelo, os autores consideraram apenas a raspagem, visto que os sucessivos enxágues consumiam parte significativa dos granizos.

O **Protocolo 2** é semelhante ao adotado por Šantl-Temkiv et al. (2013), exceto pelo fato de não envolver a mistura de 1% de cloreto de benzalcônio na solução de etanol em água deionizada. Apesar de utilizado o método de enxágue, vale notar que Christner et al. (2005) recomendam que as amostras sejam raspadas e completamente lavadas com 95% de etanol e apenas o enxágue final seja feito com água deionizada estéril. Para esses autores o uso de água deionizada estéril (4 °C) nos enxágues iniciais pode resultar em fraturas devido à diferença de temperatura que facilita a entrada de contaminantes a partir da superfície.

Ao analisar, portanto, os quatro protocolos de descontaminação testados verificou-se que o **Protocolo 3** apresentou as menores quantidades de colônias bacterianas cultivadas,

revelando-se portanto, o melhor procedimento para a descontaminação dos blocos de gelo. Dessa forma, este foi o método adotado para a realização da descontaminação das amostras de granizo deste trabalho.

#### 5.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA – CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS ENCONTRADAS NO GRANIZO

Após o plaqueamento em meio MHA e incubação das amostras de granizo, as colônias formadas foram contadas e caracterizadas de acordo com o tamanho, cor, forma e tipo de borda. As características das colônias representativas observadas em cada amostra, bem como a identificação morfológica dos grupos microbianos e a formação de esporos são apresentadas na sequência e complementadas pelo Apêndice 2.

Os isolados representativos obtidos a partir do cultivo das amostras de granizo de cada ponto de coleta foram nomeados de acordo com o ponto de coleta. Os isolados dos pontos **BJ-Ki**, **BJ-06**, **BJ-11**, e **BA-Est** foram denominados **BJ.Ki-Axx**, **BJ.06-Axx**, **BJ.11-Axx** e **BA.Est-Axx**, respectivamente, onde **xx** é uma numeração atribuída (**Figura 04**). Nas amostras de granizo dos pontos **BJ-12** e **BJ-58** não foi observada a formação de colônias bacterianas.

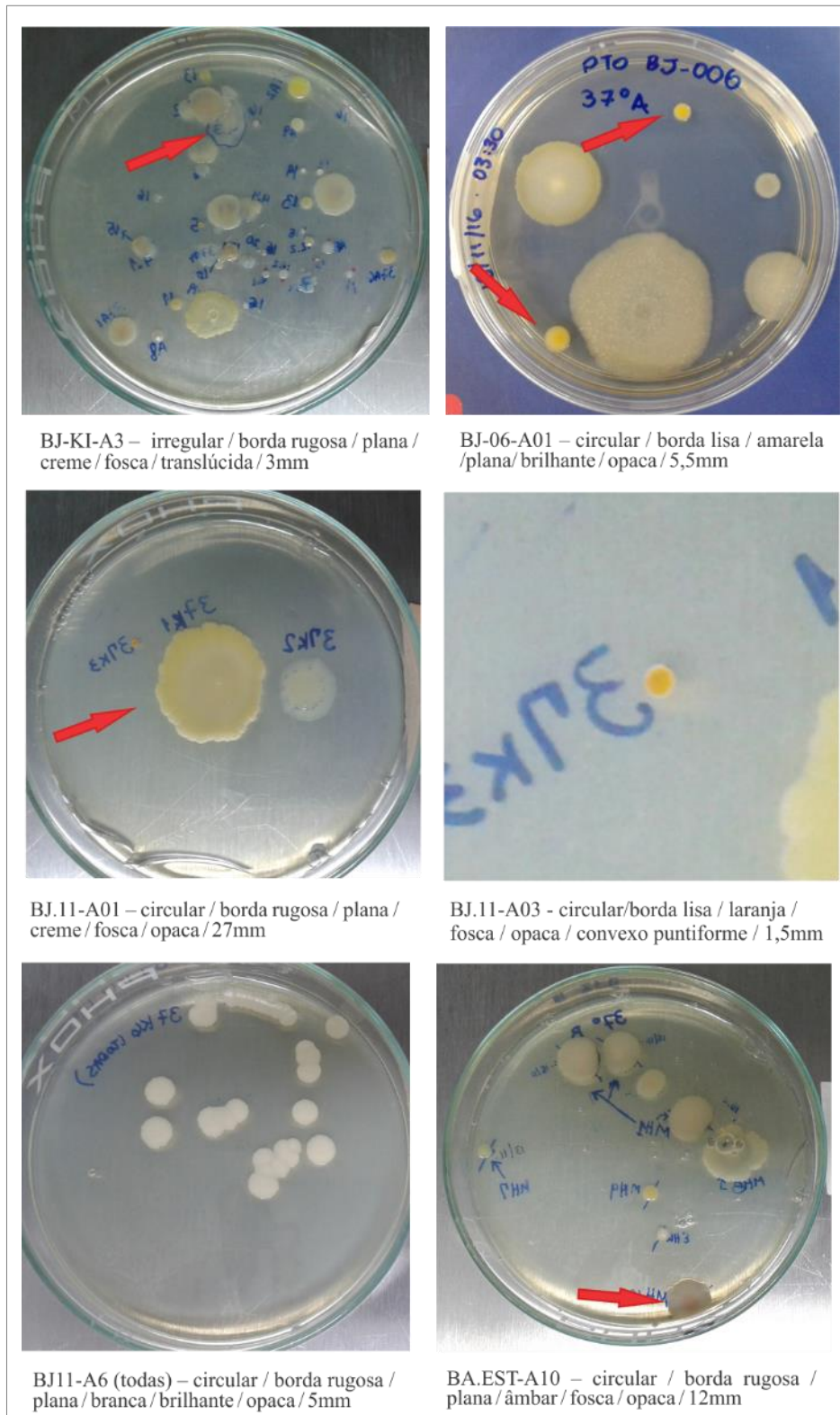
Isolados									
Ponto BJ-Ki						Ponto BJ-06	Ponto BJ-11	Ponto BA-EST	
BJ.Ki-A01	BJ.Ki-A10	BJ.Ki-A19	BJ.Ki-A28	BJ.Ki-A37	BJ.Ki-A46	BJ.06-A01	BJ.11-A01	BA.EST-A01	BA.EST-A10
BJ.Ki-A02	BJ.Ki-A11	BJ.Ki-A20	BJ.Ki-A29	BJ.Ki-A38	BJ.Ki-A47	BJ.06-A02	BJ.11-A02	BA.EST-A02	BA.EST-A11
BJ.Ki-A03	BJ.Ki-A12	BJ.Ki-A21	BJ.Ki-A30	BJ.Ki-A39	BJ.Ki-A48	BJ.06-A03	BJ.11-A03	BA.EST-A03	BA.EST-A12
BJ.Ki-A04	BJ.Ki-A13	BJ.Ki-A22	BJ.Ki-A31	BJ.Ki-A40	BJ.Ki-A49	BJ.06-A04	BJ.11-A04	BA.EST-A04	BA.EST-A13
BJ.Ki-A05	BJ.Ki-A14	BJ.Ki-A23	BJ.Ki-A32	BJ.Ki-A41	BJ.Ki-A50		BJ.11-A05	BA.EST-A05	
BJ.Ki-A06	BJ.Ki-A15	BJ.Ki-A24	BJ.Ki-A33	BJ.Ki-A42	BJ.Ki-A51		BJ.11-A06	BA.EST-A06	
BJ.Ki-A07	BJ.Ki-A16	BJ.Ki-A25	BJ.Ki-A34	BJ.Ki-A43	BJ.Ki-A52			BA.EST-A07	
BJ.Ki-A08	BJ.Ki-A17	BJ.Ki-A26	BJ.Ki-A35	BJ.Ki-A44	BJ.Ki-A53			BA.EST-A08	
BJ.Ki-A09	BJ.Ki-A18	BJ.Ki-A27	BJ.Ki-A36	BJ.Ki-A45				BA.EST-A09	

**Figura 04.** Nomenclatura dos isolados representativos identificados no cultivo bacteriano das amostras de granizo.

Com base em análises visuais foram identificados no total 76 isolados representativos das colônias cultivadas das amostras de todos os pontos de coleta, sendo díspar a proporção associada a cada ponto de coleta. Desse total, 70% pertenceram ao ponto BJ-Ki, 17%, ao ponto BA-Est, 8% pertenceram ao ponto BJ-11 e 5%, ao ponto BJ-06. As quantidades totais de UFC observadas nas amostras de granizo cultivadas constam no **Apêndice 2**.

Com relação ao número de UFC, para cada ponto de coleta foi possível observar que determinados isolados se destacaram por ocorrerem em maior frequência. No ponto BJ-Ki, os

isolados A36 e A04 apresentaram 110 e 90 UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto os demais apresentaram, em média, 16 UFC.mL<sup>-1</sup>. No ponto BJ-11 o isolado A06 apresentou 320 UFC.mL<sup>-1</sup>, enquanto o isolado BJ.11-A01 apresentou 20 UFC.mL<sup>-1</sup>, e os demais isolados apresentaram 10 UFC.mL<sup>-1</sup>. Em relação ao ponto BA-Est, o isolado A01 apresentou 150 UFC.mL<sup>-1</sup>, o isolado A2, 50 UFC.mL<sup>-1</sup>, e o isolado A3, 20 UFC.mL<sup>-1</sup>, enquanto os demais apresentaram 10 UFC.mL<sup>-1</sup> cada. Alguns exemplos das colônias visualizadas e as descrições atribuídas a elas são mostrados na **Figura 05**.

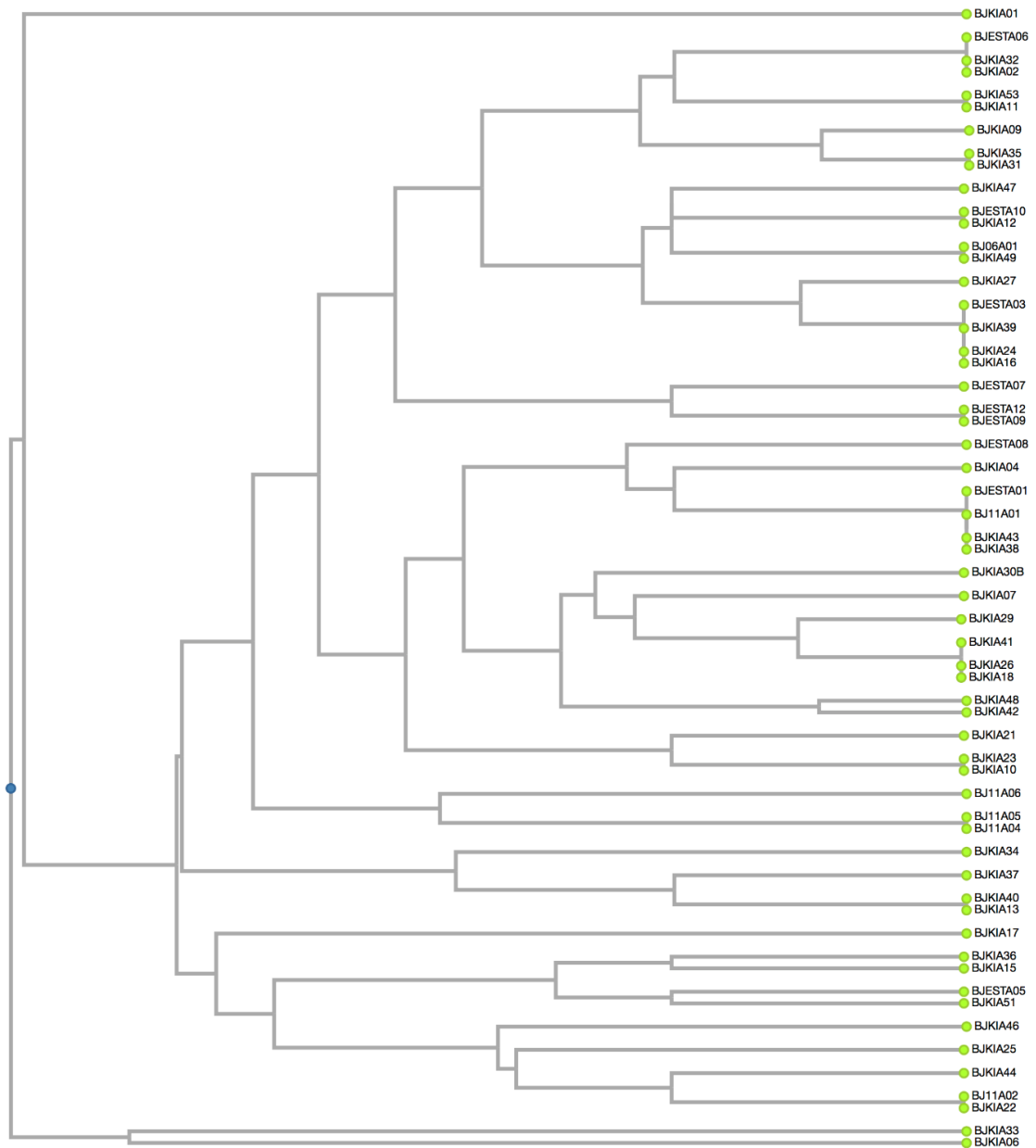


**Figura 05.** Exemplos de colônias cultivadas a partir das amostras de grão, observadas a olho nu, com suas respectivas caracterizações, de acordo com forma, borda, elevação, cor, brilho, opacidade e tamanho. O nome de cada isolado encontra-se abaixo da respectiva foto; nas imagens onde aparecem mais de um tipo de colônia, aquela referente ao isolado em questão encontra-se indicada (flecha). Fonte: a autora.

A partir das características coloniais e morfotintórias elaborou-se um dendrograma fenotípico a fim de verificar proximidades entre os isolados.

## 5.5 SELEÇÃO DE ISOLADOS PARA SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

O dendrograma fenotípico gerado pelo programa UPGMA (**Figura 06**), mostra os agrupamentos dos isolados, indicando relações de proximidade de características entre eles. Com base na estrutura do dendrograma foram selecionados 22 isolados, contemplando os grandes agrupamentos identificados, para envio ao sequenciamento genético (**Figura 07**).



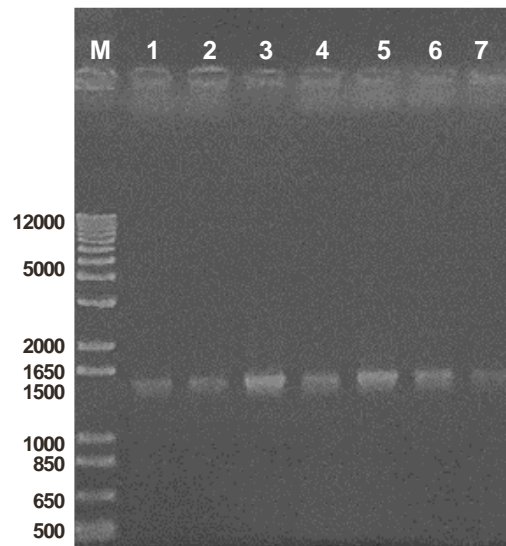
**Figura 06** - Dendrograma gerado a partir do algoritmo UPGMA para verificação de proximidades entre os isolados cultiváveis encontrados. Fonte: UPGMA - <http://genomes.urv.cat/UPGMA/> com modificações.

Ponto Kiosk		Ponto BJ-06	Ponto BJ-11	Ponto BA-EST
1 - KI-A04	8 - KI-A21			
2 - KI-A06	9 - KI-A30B			19 - BA-EST-A03
3 - KI-A09	10 - KI-A34		16 - BJ-11-A02	20 - BA-EST-A06
4 - KI-A10	11 - KI-A40	15 - BJ-06-A01	17 - BJ-11-A05	21 - BA-EST-A08
5 - KI-A11	12 - KI-A44		18 - BJ-11-A06	22 - BA-EST-A10
6 - KI-A15	13 - KI-A47			
7 - KI-A17	14 - KI-A51			

**Figura 07.** Isolados selecionados a partir do dendrograma para a etapa de sequenciamento genético.

## 5.6 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S – RNAr

Os isolados selecionados foram submetidos a PCR para amplificação da quantidade de genes a seguirem para sequenciamento. A reação apresentou resultados com bandas bem visíveis para a maioria das amostras, sendo que grande parte delas indicou a presença de 1500 pares de bases, de acordo com o esperado (**Figura 08**).



**Figura 08.** Gel representativo do amplicon da região 16S resultante da PCR; Canaleta M = marcador de peso molecular - Ladder DNA 1Kb Plus (pb); Canaleta 1 – **BJ.11-A2**; Canaleta 2 – **BJ.11-A5**; Canaleta 3 – **BJ.11-A6**; Canaleta 4 – **BA.EST-A3**; Canaleta 5 – **BA.EST-A6**; Canaleta 6 – **BA.EST-A8**; Canaleta 7 – **BA.EST-A10**.



## 5.7 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE COMPARATIVA DE SEQUÊNCIAS (BLAST)

Dos 22 isolados enviados para sequenciamento, 12 foram identificados (**Figura 09**). Os demais isolados apresentaram limitações no processo de identificação, decorrentes da qualidade do resultado do sequenciamento.

Isolado	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	N° Ref. GenBank	Gram	Esporu- lação	Forma
BJ.KI-A11	Actinobac- teria	Actinobacteria	Micro- coccales	Micro- bacteriaceae	Microbac- terium	<i>Microbacterium oleivorans strain BAS69</i>	NR_042262.1	G- positivo	Não	Bacilo irreg.
BJ.KI-A15					Curtobac- terium	<i>Curtobacterium citreum strain DSM 20528</i>	NR_026156.1	G- positivo	Não	Bacilo irreg.
BJ.KI-A34	Proteobac- teria	Gamma- proteobacteria	Legionellales	Legionella- ceae	Legionella	<i>Legionella oakridgensis strain OR-10</i>	NR_121730.1	G- negativo	Não	Bacilo
BJ.KI-A21	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Oceanoba- cillus	<i>Oceanobacillus oncorhynchi subsp. incaldanensis strain 20AG</i>	NR_042257.1	G- positivo	Não	Bacilo
BJ.KI-A44					Bacillus	<i>Bacillus marisflavi strain TF-11</i>	NR_118437.1	G- positivo/ variável	Sim	Bacilo
BJ.11-A02						<i>Bacillus humi strain LMG 22167</i>	NR_025626.1	G- positivo	Sim	Bacilo
BA.EST- A10						<i>[Brevibacterium] frigoritolerans strain DSM 8801</i>	NR_117474.1	G- positivo	Sim	Bacilo
BJ.KI-A04				Paeniba- cillaceae	Paenibacillus	<i>Paenibacillus camelliae strain b11s-2</i>	NR_116303.1	G- positivo	Sim	Bacilo
BJ.KI-A10						<i>Paenibacillus camelliae strain b11s-2</i>	NR_116303.1	G- positivo	Sim	Bacilo
BJ.11-A05						<i>Paenibacillus oceanisediminis strain L10</i>	NR_118217.1	G- negativo	Sim	Bacilo
BJ.KI-A06				Planoco- coccaceae	Sporosarcina	<i>Sporosarcina luteola strain NBRC 105378</i>	NR_114283.1	Variável	Sim	Bacilo
BJ.11-A06				Staphylo- coccaceae	Staphylo- coccus	<i>Staphylococcus xylosus strain JCM 2418</i>	NR_113350.1	G- positivo	Não	Coco

**Figura 09.** Identificação das espécies bacterianas cultiváveis obtidas a partir das amostras de granizos, com a utilização da ferramenta BLAST, e caracterização morfolotintorial e de formação de esporos.

As bactérias, identificadas com base na sua sequência do gene 16S RNAr, pertenceram aos filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* e aos gêneros *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Legionella*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus*. Os 12 isolados identificados revelaram 11 espécies não repetidas, já que *Paenibacillus camelliae* foi identificada tanto para o isolado BJ.KI-A04 quanto para o BJ.KI-A10.

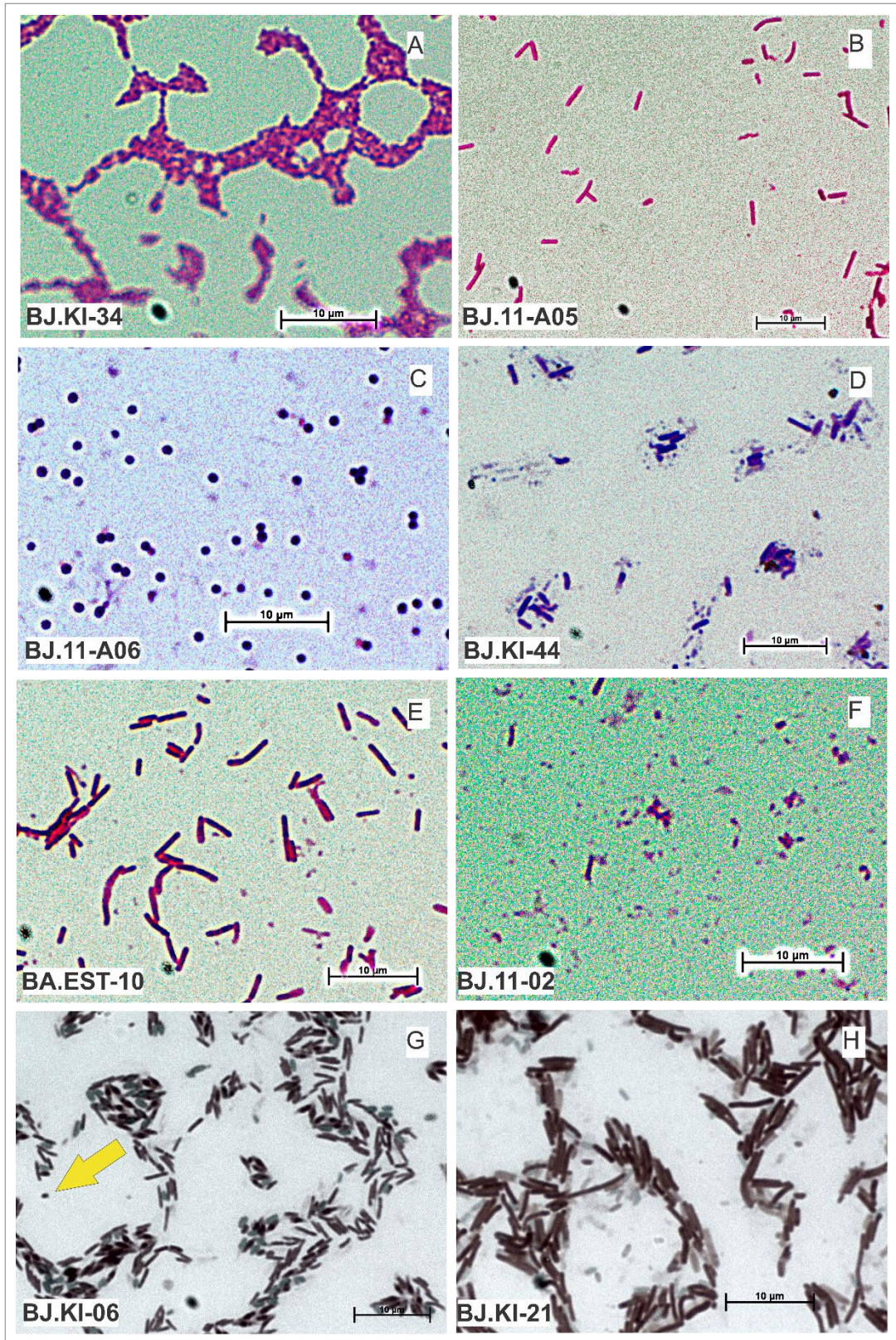
A não identificação dos isolados está relacionada à qualidade da sequência gênica ou à inconclusão no processo de busca de similaridades no BLAST. Neste sentido, relatam-se três situações diferentes: i) os isolados BJ.KI-A51 e BJ.06-A01 não apresentaram resultados válidos provenientes do sequenciamento; ii) os isolados BJ.KI-A09, BJ.KI-A17, BJ.KI-A40, BJ.KI-A47, BA.EST-A06 e BA.EST-A08 não apresentaram similaridades significativas com nenhuma sequência no GenBank; iii) os isolados BJ.KI-A30B e BA.EST-A03 não apresentaram resultados no BLAST.

Sabe-se que sequências muito curtas ou com grande número de incertezas prejudicam a identificação dos organismos no BLAST. A qualidade do resultado do sequenciamento pode estar relacionada à quantidade e à qualidade de DNA disponível para o procedimento do sequenciamento, de modo que os resultados das amplificações realizadas por PCR, bem como as condições de transporte das amostras podem ter configurado fatores intervenientes nesse processo.

Em relação à análise dos resultados foram avaliadas as características de Gram, presença de esporos, morfologia e *Taxa*, que serão apresentadas a seguir.

## **Gram**

Das 11 espécies identificadas, uma, *Sporosarcina luteola* - strain NBRC 105378, é considerada como Gram-variável (TOMINAGA, et al., 2009); oito são Gram-positivas (2 *Actinobacteria*, 6 *Firmicutes*) e duas são Gram-negativas (1 *Proteobacteria* e 1 *Firmicutes*). A **Figura 10** apresenta oito dos isolados identificados.



**Figura 10** - Células dos isolados sequenciados observadas em microscópio e as respectivas classificações atribuídas. A - *Legionella oakridgensis* strain OR-10 - Bacilo, Gram-negativo; B - *Paenibacillus oceanisediminis* strain L10 - Bacilo, Gram-negativo; C - *Staphylococcus xylosus* strain JCM 2418 - Coco, Gram-positivo; D - *Bacillus marisflavi* strain TF-11- Bacilo, Gram-positivo/variável; E - *[Brevibacterium] frigoritolerans* strain DSM 8801 - Bacilo, Gram-positivo; F - *Bacillus humi* strain LMG 22167 - Bacilo, Gram-positivo; G - *Sporosarcina luteola* strain NBRC 105378 - Bacilo, Gram-variável, (detalhe para esporo); H - *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis* strain 20AG - Bacilo, Gram-positivo. Fonte: a autora.

A predominância de cepas Gram-positivas também foi observada em estudos sobre água da nuvem, mostrando que a dentro da fração cultivável de bactérias, as Gram-positivas são geralmente mais abundantes no ar do que as Gram-negativas (SHAFFER e LIGHTHART, 1997; AMATO et al., 2007; FANG et al., 2016). Esta observação é sustentada por experiências de laboratório que mostram que as bactérias Gram-negativas perdem cultivabilidade após serem aerossolizadas (HEIDELBERG et al., 1997; DESPRÉS et al., 2012). Outros autores encontraram predominantemente bactérias Gram-positivas em amostras de aerossóis naturais (LIGHTHART, 1997; BELAN et al., 1999).

Em estudo sobre microrganismos aeróbicos cultiváveis presentes em água de nuvem, Amato et al. (2007) obtiveram 61 isolados identificados, sendo 61% Gram-positivas e 39% Gram-negativas. Além disso, a comparação da distribuição temporal das bactérias no referido estudo levou à conclusão de que o número de bactérias Gram-negativas foi maior no verão do que no inverno.

No estudo de Fang et al. (2016) a porcentagem de bactérias Gram-positivas encontradas no ar de vários tipos de ambientes urbanos de Hangzhou (China) foi significativamente maior que a das bactérias Gram-negativas, representando 88,2% do total. Do mesmo modo que os últimos autores, Lou, Fang e Si (2012) encontraram porcentagens muito semelhantes (84 a 90% do número total) de bactérias Gram-positivas superando o de bactérias Gram-negativas em amostras de ar em uma faculdade da mesma cidade.

Os valores encontrados neste trabalho, com as Gram-positivas sendo majoritárias (representando cerca de 73% do total), são coerentes com os resultados observados em amostras de água de nuvem, e amostras de ar em outras partes do mundo. No estudo de revisão de GANDOLFI et al. (2013) sobre a diversidade bacteriana na atmosfera afirma-se que, embora os estudos sobre microrganismos no ar tenham sido conduzidos em locais de variadas condições ambientais (urbano, rural, florestais, camada atmosférica e alta troposfera), 70-90% dos isolados eram geralmente bactérias Gram-positivas. Deve ser observado ainda que, de acordo com Fang et al. (2016) e Nicholson et al. (2000), em condições ambientais externas adversas, como a baixa disponibilidade de nutrientes, dessecação e intensa radiação solar, as bactérias Gram-positivas são muito mais resistentes do que as Gram-negativas.

É importante ressaltar que a predominância de bactérias Gram-positivas nada tem a ver com o fato de que bactérias Gram-negativas, segundo alguns autores (como já citado anteriormente neste trabalho) mostram ter melhores desempenhos na atividade de nucleação de gelo.

A única espécie Gram-variável identificada foi *Sporosarcina luteola*, uma bactéria formadora de esporos, oriunda do ambiente, registrada pela primeira vez, por Tominaga et al. (2009) a partir de equipamento (*hopper*) utilizado no processo de produção de molho de soja, no Japão. Portanto, a presença majoritária das bactérias Gram-positivas em amostras de água de nuvem e granizo (no caso deste trabalho) parece coerente com o fato de que, nessas condições (em suspensão na atmosfera), as bactérias podem estar mais propensas a experimentar condições ambientais extremas ou adversas, como dessecação, intensa radiação solar, limitação de nutrientes, entre outras.

### ***Esporos***

Com relação à produção de esporos, as espécies capazes de gerar esporos (54%) superaram as não produtoras (45%). Dentre as espécies conhecidas, os endósporos de bactérias Gram-positivas com baixo valor de G+C são os mais resistentes a condições mais adversas (UNIVERSIDADE DE CORNELL, 2017). De acordo com KELLOGG e GRIFFIN (2006), quatro estudos (PROSPERO et al., 2005, GRIFFIN et al., 2003, KELLOGG et al., 2004 e GRIFFIN et al., 2001) sobre poeira da África identificaram isolados bacterianos na atmosfera, entre os quais a maioria foi Gram-positiva e muitos foram formadores de esporos, o que os torna mais resistentes à dessecação, e mais prováveis de sobreviverem a transportes transoceânicos em eventos de transporte de poeira. Nesses estudos houve predominância numérica do gênero *Bacillus* (PROSPERO et al., 2005, GRIFFIN et al., 2003, KELLOGG et al., 2004) e do gênero *Microbacterium* (GRIFFIN et al., 2003 e GRIFFIN et al., 2001).

Algumas bactérias esporulantes (especialmente *Pseudomonas syringae*) foram encontradas entre os mais eficientes nucleadores de gelo, iniciando o congelamento em temperaturas próximas a zero, conforme mencionado anteriormente (YANKOFSKY et al., 1981; MORRIS et al., 2011). Em estudos sobre a diversidade microbiana atmosférica, por exemplo, Womack et al. (2010), observa-se que organismos formadores de esporos, tais como espécies do gênero *Bacillus* e outras Gram-positivas (encontradas neste trabalho), podem apresentar longo alcance geográfico e são predominantes em pesquisas que utilizam métodos dependentes de cultura.

### ***Morfologia***

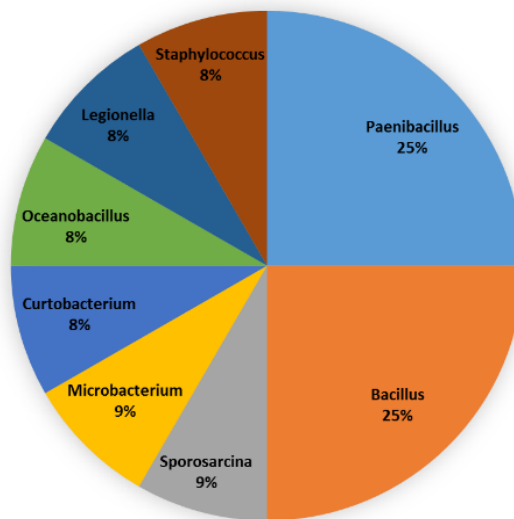
Dentre as 11 espécies identificadas, 10 foram identificadas com o formato bacilo e apresentaram 3 UFC (BJ.KI-A15 e BJ.KI-21) ou 1 UFC (demais isolados). O *Staphylococcus xylosus*, strain JCM 2418 (isolado BJ.11-A06), foi a única espécie identificada como coco, e

apresentou o maior número de UFC no cultivo em ágar, contabilizando 32 UFC. De maneira diversa, no estudo de Fang et al. (2016), as amostras de ar oriundas de diversos ambientes urbanos na cidade de Hangzhou (China) apresentaram predominância de cocos em relação a bacilos.

Segundo Madigan (2010), *Sporosarcina* é um gênero singular dentre os formadores de endósporos, diferenciando-se principalmente por ocorrer no formato de cocos ao invés de bacilos. No entanto, Tominaga et al. (2009) caracteriza a espécie *Sporosarcina luteola*, strain NBRC 105378 como bacilo.

### Taxa

Os oito gêneros das bactérias identificadas são apresentados na Figura 11. Observa-se a predominância de *Bacillus* e *Paenibacillus*, representando, juntos, 50% das espécies identificadas.



**Figura 11** - Gêneros encontrados nos isolados bacterianos das amostras de granizo.

Em estudo semelhante que investigou características químicas e microbiológicas de pedras de granizo coletadas na região de Ljubljana, Eslovênia, Šantl-Temkiv et al. (2013) encontraram, para as comunidades cultiváveis, os gêneros: *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Chelatococcus*, *Microvigna*, *Afipia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, com notável contribuição de bactérias típicas de superfícies de plantas (*Methylobacterium*). Provável justificativa dos autores seria o fato de essas bactérias serem mais bem adaptadas às condições de sobrevivência e crescimento na atmosfera, por já estarem adaptadas a fatores de estresse comuns às superfícies das plantas, tais como dessecação e

radiação UV. *Bacillus* e *Paenibacillus*, gêneros majoritários neste trabalho, também foram majoritários em 3 dos 9 grânizos analisados por Šantl-Temkiv et al. (2013).

O gênero *Bacillus* é encontrado nos mais diversos ambientes, tais como solo, podendo ocorrer também em ambientes extremos, com alto pH (*B. alcalophilus*), alta temperatura (*B. thermophilus*) ou alto teor de sal (*B. halodurans*) (SLONCZEWSKI; FOSTER, 2011). Além disso, estudos como os de Shen e Yao (2013) demonstram que as espécies de *Bacillus* podem ser eficientes nucleadores de gelo.

O gênero *Paenibacillus* encontra-se também presente em vários ambientes. Sua capacidade de formar esporos e a produção de diversas enzimas degradantes possibilitam que o gênero persista em diversos ambientes (OH et al., 2008). As espécies de *Paenibacillus* foram isoladas de uma grande variedade de fontes, incluindo sedimentos antárticos (MONTES et al., 2004), ar (RIVAS et al., 2005b), rizosfera (RIVAS et al., 2005a), filosfera (RIVAS et al., 2005c), solos alcalinos (YOON et al., 2005), fezes de vaca (VELÁZQUEZ et al., 2004), ervas de jardim (ŠMERDA et al., 2005), campos de arroz (SÁNCHEZ et al., 2005), solos (KANZAWA et al., 1995). Indivíduos do gênero *Paenibacillus*, assim como os do gênero *Bacillus*, muito provavelmente existem no ar na forma de endósporos, o que limita o seu crescimento na atmosfera (ŠANTL-TEMKIV et al., 2013).

Do gênero *Sporosarcina* são conhecidas apenas 10 espécies. A última espécie a ser introduzida neste gênero foi encontrada em amostras de solo da Antártica (YU et al., 2008). Não foram encontradas espécies deste gênero nos outros estudos de grânizo. Também não foram encontrados estudos na literatura relatando a ocorrência desse gênero em amostras de ar ou água de nuvem.

Nos resultados obtidos em uma investigação sistemática sobre as variedades de composição, concentração e distribuição de tamanho de bactérias transportadas pelo ar em um campus universitário em Hangzhou (China), Lou, Fang e Si (2012) identificaram 22 gêneros de bactérias Gram-positivas, com predominância de *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, e 12 gêneros de bactérias Gram-negativas, dentre as quais *Pseudomonas* eram as mais comuns. Esses 5 gêneros dominantes ocuparam aproximadamente 60% do total.

Ao investigar comunidades bacterianas presentes na atmosfera em regiões com diferentes usos do solo, as amostras de ar analisadas por Bowers et al. (2011) revelaram que as comunidades bacterianas dominantes foram representadas pelos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*, os mesmos encontrados neste estudo. No referido trabalho as *Actinobacteria* foram mais abundantes em ambientes suburbanos e de agricultura, enquanto as *Firmicutes* foram mais comuns em regiões próximas de florestas e área suburbana. No presente



estudo foram identificadas 2 espécies de *Actinobacteria* e 8, de *Firmicutes*, porém, não é possível afirmar qual a origem dos indivíduos presentes no granizo deste trabalho, uma vez que não se conhece a dinâmica da tempestade analisada, nem sua trajetória, e tampouco a trajetória exata percorrida por esses organismos desde sua origem até o momento em que foi incorporado no granizo. De fato, a região onde as amostras deste estudo foram coletadas apresenta características agrícolas e suburbanas dominantes, porém, não é possível tirar conclusões sobre a origem das bactérias identificadas. Ainda em relação ao grupo *Firmicutes*, Urbano et al. (2011) também encontraram uma espécie de bactéria do gênero *Oceanobacillus* em estudo sobre bioaerossóis em região costeira dos Estados Unidos.

De acordo com Šantl-Temkiv et al. (2013) as *Gammaproteobacteria* indicam a influência de bactérias de origem epifítica nos granizos. Segundo Morris et al. (2008), a maior parte de bactérias nucleadoras de gelo conhecidas também tem origem epifítica. A classe das *Gammaproteobacteria* é formada por células Gram-negativas e apresenta exemplares importantes de bactérias fitopatogênicas, tais como *Xanthomonas axonopodis* (causadora do câncer cítrico), *Xylella fastidiosa* (causadora de doenças conhecidas como a praga do amarelinho que atinge laranjeiras) e *Pseudomonas syringae*. Neste trabalho apenas o isolado *Legionella oakridgensis* pertence à classe das *Gammaproteobacteria*.

Por fim, a referência literária citada no NCBI que descreve cada uma das 11 espécies encontradas nas amostras de granizo analisadas neste estudo encontra-se na **Tabela 04**.

**Tabela 04** - Origem dos isolados bacterianos das amostras de granizo.

<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	<b>Referência</b>
<i>Microbacterium oleivorans</i> strain BAS69	Caverna de armazenamento de petróleo (Etzel, Alemanha)	Schippers et al. (2005)
<i>Curtobacterium citreum</i> strain DSM 20528	Arroz	Yamada e Komagata (1972); DSMZ, (2017)
<i>Legionella oakridgensis</i> strain OR-10	Toalhas de resfriamento industriais Água subterrânea	Orrison et al. (1983); Brzuszkiewicz et al. (2013)
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> subsp. <i>incaldanensis</i> strain 20AG	Alga oriunda de gêiser (sul da Itália)	Romano et al. (2006)
<i>Bacillus marisflavi</i> strain TF-11	Matéria orgânica de mares (mar amarelo)	Yoon et al. (2003)
<i>Bacillus humi</i> strain LMG 22167	Áreas agrícolas (Holanda)	Heyrman et al (2004)
<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> strain DSM 8801	Solos áridos (Marrocos) Solo onde foi plantada azeitona (Aydin)	Delaporte e Sasson (1967); Yaman et al (2017)
<i>Paenibacillus camelliae</i> strain b11s-2	Chá Pu'er fermentado a partir da planta <i>Camellia sinensis</i>	Oh et al. (2008)
<i>Paenibacillus oceanisediminis</i> strain L10	Sedimento marinho (baía de Gongjin - Coréia do Sul)	Lee et al. (2013)
<i>Sporosarcina luteola</i> strain NBRC 105378	Equipamento (“hopper”) utilizado no processo de produção de molho de soja - Japão	Tominaga et al. (2009)
<i>Staphylococcus xylosus</i> strain JCM 2418	Pele humana (Raleigh, EUA)	Schleifer e Kloos, (1975)

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho se propôs a realizar uma caracterização microbiológica de amostras de granizo coletadas após um evento de tempestade ocorrido na região sudoeste do Paraná, com o objetivo de fornecer subsídios que contribuam com estudos futuros voltados à compreensão do papel desempenhado por microrganismos no processo de formação de gelo na atmosfera da região de estudo. Ao avaliar quatro distintos protocolos para descontaminação das amostras granizo, identificou-se que o processo de sucessivo de enxágues com solução de ácido clorídrico 0,01N apresentou a maior eficácia nas condições testadas, sendo este o método utilizado na descontaminação das amostras deste trabalho. Com relação às propriedades físicas médias dos granizos coletados, os valores observados estão de acordo com o que consta na literatura. O isolamento de microrganismos das amostras de granizo permitiu a identificação de 8 gêneros e 11 espécies de bactérias distintas. As bactérias identificadas foram majoritariamente Gram-positivas e sua origem é atribuída a ambientes naturais da superfície terrestre. Pouco mais da metade das espécies encontradas são produtoras de esporos, e todas, com exceção de uma, apresentam formato de bacilo. Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* representaram 50% das espécies identificadas e foram apontados em outros estudos como potenciais nucleadores de gelo. Ambos os gêneros foram identificados em estudo similar, também como majoritários em parte das pedras de granizo analisadas. Em buscas feitas na literatura, não foram encontrados estudos anteriores com o gênero *Sporosarcina* associado a amostras de ar, água de nuvem ou granizo.

Como sugestões para estudos futuros é possível citar várias alternativas, uma vez que este foi apenas um ponto de partida para estudos futuros sobre a ocorrência de granizo e a sua relação com os microrganismos, em especial, na região contemplada. Faz-se intensamente desejável, por exemplo, a realização de testes de nucleação de gelo com os microrganismos identificados neste trabalho, e análises para a verificação da presença de genes nucleadores de gene (INA) nessas bactérias. Também é possível fazer novas análises complementares, como por exemplo, a contagem total de células presentes nas pedras de granizo individuais, por meio de citometria de fluxo, e a verificação da porcentagem de células cultiváveis, tanto para a mesma tempestade (porque há amostras disponíveis) como para outros eventos de chuva. Outra opção para estudos futuros é a realização do sequenciamento e a identificação da totalidade dos isolados bacterianos cultiváveis obtidos, analisando-os de acordo com o ponto de coleta. Dessa forma serão possíveis análises que levem em consideração a distribuição espacial e a diversidade dos microrganismos dos granizos. Sugere-se ainda o estudo da evolução da

tempestade e o seu e o rastreamento através das imagens de satélites e outras técnicas, buscando possíveis alternativas para a proveniência dos microrganismos. Também com relação à rastreabilidade dos microrganismos identificados, indica-se a realização de análises capazes de traçar a relação filogenética entre espécies, como a árvore filogenética, por exemplo, feita em software apropriado, que informará quais os organismos conhecidos pela Ciência encontram-se relacionados a eles, além de técnicas laboratoriais como RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA).

## REFERÊNCIAS

- ALFARO, S. C.; GOMES, L. Modeling mineral aerosol production by wind erosion: Emission intensities and aerosol size distributions in source areas, **J. Geophys. Res.**, V. 106, p. 18075–18084, 2001.
- AMATO, P. et al. Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: Implications for the chemistry of clouds. **Atmospheric Environment**, v. 39, n. 22, p. 4143–4153, 2005.
- 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.
- AMIRO, B. D.; CANTIN, A.; FLANNIGAN, M. D.; DE GROOT, W. J. Future emissions from Canadian boreal forest fires, **Can. J. Forest Res.**, V. 39, p. 383–395, 2009.
- AMS. Meteorology Glossary, American Meteorological Society, 2012. Disponível em: <http://glossary.ametsoc.org/wiki/Hailstone>. Acesso em Jul. 2017.
- ANDERSON, B. J.; HALLETT, J. **Supersaturation and Time Dependence of Ice Nucleation from the Vapor on Single Crystal Substrates** *Journal of the Atmospheric Sciences*, 1976. .
- ANDREAE, M. O.; ANDREAE, T. W. The cycle of biogenic sulfur compounds over the Amazon Basin, I, Dry season, **J. Geophys. Res.**, V. 93, p. 1487–1497, 1988.
- ANDREAE, M. O.; ROSENFELD, D.; ARTAXO, P.; COSTA, A. A.; FRANK, G. P.; LONGO, K. M.; SILVA-DIAS, M. A. F. Smoking rain clouds over the Amazon, **Science**, V. 303, p. 1337–1342, 2004.
- ANDREAE, M. O. Aerosols before pollution, **Science**, V. 315, n. 50–51, p. 5808, 2007.
- ARAN, M.; SAIROUNI, A.; BECH, J.; TODA, J.; RIGO, T.; CUNILLERA, J.; MORÉ, J. Pilot project for intensive surveillance of hail events in Terres de Ponent (Lleida), **Atmos. Res.**, V.83, n. 2, p. 315–335, 2007.
- ARCHER, S. Crucial uncertainties in predicting biological control of DMS emission, **Environ. Chem.**, V. 4, p. 404–405, 2007.

ARIMOTO, R. Aeolian dust and climate: relationships to sources, tropospheric chemistry, transport and deposition, **Earth Sci. Rev.**, V. 54, p. 29–42, 2001.

ARIYA, P. A.; AMYOT, M. New directions: The role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics, **Atmos. Environ.**, V. 38, p. 1231–1232, 2004.

ARIYA, P. A.; SUN, J.; ELTOUNY, N. A.; HUDSON, E. D.; HAYES, C. T.; KOS, G. Physical and chemical characterization of bioaerosols—Implications for nucleation processes, **Int. Rev. Phys. Chem.**, V. 28, n. 1, 1–32, 2009,

ARNETH, A.; MONSON, R. K.; SCHURGERS, G.; NIINEMETS, U.; PALMER, P. I. Why are estimates of global terrestrial isoprene emissions so similar (and why is this not so for monoterpenes)?, **Atmos. Chem. Phys.**, V. 8, p. 4605–4620, 2008.

ARORA, V. K.; BOER, G. J. Fire as an interactive component of dynamic vegetation models, **J. Geophys. Res.**, V. 110, 2005.

ARTAXO, P.; HANSSON, H. C. Size distribution of biogenic aerosol particles from the Amazon Basin, **Atmos. Environ.**, V. 29, p. 393–402, 1995.

ATKINSON, J. D.; MURRAY, B. J.; WOODHOUSE, M. T.; WHALE, T. F.; BAUSTIAN, K. J.; CARSLAW, K. S.; DOBBIE, S.; O'SULLIVAN, D.; MALKIN, T. L. The importance of feldspar for ice nucleation by mineral dust in mixed-phase clouds, **Nature**, V. 498, p. 355–358, 2013.

AYERS, G. P.; CAINEY, J. M.; GILLETT, R. W.; IVEY, J. P. Atmospheric sulphur and cloud condensation nuclei in marine air in the southern Hemisphere, **Phil. Trans. Roy. Soc. B**, V. 352, p. 203–211, 1997.

BALASCH, S.; ROMERO, R.; FERRER, A. A logistic regression model applied to evaluate the influence of operating time of AgI ground acetonic generators on the size and hardness of hail. **Nat. Hazards**, V. 32, p. 345–355, 2004.

BARNES, I.; HJORTH, J.; MIHALOPOULOS, N. Dimethyl sulfide and dimethyl sulfoxide and their oxidation in the atmosphere, **Chem. Rev.**, V. 106, p. 940–975, 2006.

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**, V. 108, n. 21, p. 4658, 4, 2003.

BEDKA, K.M. Overshooting cloud top detections using MSG SEVIRI infrared brightness temperatures and their relationship to severe weather over Europe. **Atmos. Res.**, V. 99, n. 2, p. 175–189, 2011.

BELAN, B. D.; BORODULIN, A. I.; BURYAK', G. A.; OLKIN, S. E.; PANCHENKO, M. V.; PETRISCHENKO, V. A.; PYANKOV, O. V.; RESNIKOVA, I. K.; SAFATOV, A. S.; SERGEEV, A. N. Preliminary estimation of atmospheric biogenic aerosols over a forest area in the south of western Siberia. **J Aerosol Sci**, v. 30, p. 817–818, 1999.

BERTHET, C.; WESOLEK, E.; DESSENS, J.; SÁNCHEZ, J.L. Extreme hail day climatology in southwestern France. **Atmos. Res.**, V. 123, p. 139–150, 2013.

BIGG, E. K.; LECK, C. The composition of fragments of bubbles bursting at the ocean surface, **J. Geophys. Res.**, V. 113, 2008.

BIGG, E.K.; TURTON, E. Delayed effects of cloud seeding with silver iodide. **J. Clim. Appl. Meteorol.**, V. 25, p. 1382-1386, 1986.

BISEN, P.S., **Microbes in Practice**. IK International, New Delhi, p. 139-155, 2014.

BOPP, L.; AUMONT, O.; BELVISO, S.; MONFRAY, P. Potential impact of climate change on marine dimethyl sulfide emissions, **Tellus B**, V. 55, p. 11–22, 2003.

BOPP, L.; BOUCHER, O.; AUMONT, O.; BELVISO, S.; DUFRESNE, J. L.; MONFRAY, P.; PHAM, M. Will marine dimethylsulfide emissions amplify or alleviate global warming?, **Can. J. Marine Fish.**, V. 61, p. 826–835, 2004.

BOUCHER, O.; PHAM, M. History of sulfate aerosol radiative forcings, **Geophys. Res. Lett.**, V. 29, p. 1308, 2002.

BOWERS, R. M.; MCLETCHE, S.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of potential source environments. **The ISME journal**, v. 5, n. 4, p. 601–12, 2011.

BOYD, P. W. Environmental factors controlling phytoplankton processes in the southern ocean, **J. Phycol.**, V. 38, p. 844–861, 2002.

BRAHAM, R. R., Jr. Some measurements of snow pellet bulk-densities. **J. Appl. Meteor.**, v. 2,

p. 498-500, 1963. BROWNING, K. A. The growth of large hail within a steady updraught. **Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society**, v. 89, n. 382, p. 490–506, 1963.

BROWNING, K. A.; LUDLAM, F. H.; MACKLIN, W. C. The density and structure of hailstones. Imperial College, London, 551.515.4:551.578.71, 1962

BRYANT, R. G.; BIGG, G. R.; MAHOWALD, N. M.; ECKARDT, F. D.; ROSS, S. G. Dust emission response to climate in southern Africa, **J. Geophys. Res.**, V. 112, 2007.

BRZUSZKIEWICZ, E.; SCHULZ, T.; RYDZEWSKI, K.; DANIEL, R.; GILLMAIER, N.; DITTMANN, C.; HOLLAND, G.; SCHUNDER, E.; LAUTNER, M.; EISENREICH, W.; LÜCK, C.; HEUNER, K. Legionella oakridgensis ATCC 33761 genome sequence and phenotypic characterization reveals its replication capacity in amoebae. **International Journal of Medical Microbiology**, V. 303, p. 514-528, 2013.

CARSLAW, K. S.; BOUCHER, O.; SPRACKLEN, D. V.; MANN, G. W.; RAE, J. G. L.; WOODWARD, S.; KULMALA, M. A review of natural aerosol interactions and feedbacks within the Earth system, **Atmos. Chem. Phys.**, V. 10, p. 1701-1737, 2010.

CASSAR, N.; BENDER, M. L.; BARNETT, B. A. The Southern ocean biological response to aeolian iron deposition, **Science**, V. 317, p. 1067–1070, 2007.

CECIL, D.J.; BLANKENSHIP, C.B. Toward a global climatology of severe hailstorms as estimated by satellite passive microwave imagers, **J. Clim.**, V. 25, n. 2, p. 687–703, 2012.

CHANGDON, S. The scales of hail, **Journal of Applied Meteorology**, V. 16, p. 626-648, 1977.

CHRISTNER, B. C.; MIKUCKI, J. A.; FOREMAN, C. M.; DENSON, J.; PRISCU, J. C. Glacial ice cores: A model system for developing extraterrestrial decontamination protocols. *Icarus*, v. 174, n. 2 SPEC. ISS., p. 572–584, 2005.

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, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, V. 105, n. 18, p. 854–859, 2008a.

CHRISTNER, B. C.; MORRIS, C. E.; FOREMAN, C. M.; CAI, R.; SANDS, D. C. Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5867, p. 1214, 2008b.



CHUNG, Y. S. On the observations of yellow sand (dust storms) in Korea. **Atmos. Environ.**, V. 26, p. 2743–2749, 1992.

CINTINEO, J.L.; SMITH, T.M.; LAKSHMANAN, V.; BROOKS, H.E.; ORTEGA, K.L. An objective high-resolution hail climatology of the contiguous United States. **Weather Forecast.**, V. 27, n. 5, p. 1235–1248, 2012

CLARK, M. R.; WEBB, J. D. C. A severe hailstorm across the English Midlands on 28 June 2012. **Weather**, V. 68, p. 284–291, 2013.

CLARKE, A. D.; OWENS, S. R.; ZHOU, J. An ultrafine sea-salt flux from breaking waves: Implications for cloud condensation nuclei in the remote marine atmosphere, **J. Geophys. Res.**, V. 111, 2006.

CROMPTON, R.P.; MCANENEV, K.J. The cost of natural disasters in Australia: the case for disaster risk reduction. **The Australian Journal of Emergency Management**, V. 23, n. 4, 2008.

DECESARI, S.; FUZZI, S.; FACCHINI, M. C.; MIRCEA, M.; EMBLICO, L.; CAVALLI, F. Characterization of the organic composition of aerosols from Rondonia, Brazil, during the LBA-SMOCC 2002 experiment and its representation through model compounds. **Atmospheric Chemistry and Physics**, V. 6, p. 375–402, 2006.

DELEON-RODRIGUEZ, N.; LATHEM, T. L.; RODRIGUEZ-R, L. M.; BARAZESH, J. M.; ANDERSON, B. E.; BEYERSDORF, A. J.; ZIEMBA, L. D.; BERGIN, M.; NENES, A.; KONSTANTINIDIS, K. T. Microbiome of the upper troposphere: species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 7, p. 2575–80, 2013.

DELOBBE, L.; HOLLEMAN, I. Uncertainties in radar echo top heights used for hail detection. **Meteorol. Appl.** V. 13, n. 4, p. 361–374, 2006.

DEMOTT, P. J.; CHEN, Y.; KREIDENWEIS, S. M.; ROGERS, D. C.; SHERMAN, D. E. Ice formation by black carbon particles, **Geophys. Res. Lett.**, V. 26, p. 2429– 2432, 1999.

DEMOTT, P. J.; PRENNI, A. J. New directions: Need for defining the numbers and sources of biological aerosols acting as ice nuclei, **Atmos. Environ.**, V. 44, n.15, p. 1944–1945, 2010.

DEMOTT, P. J.; ROGERS, D. C.; KREIDENWEIS, S. M.; CHEN, Y.; TWOHY, C. H.;

BAUMGARDNER, D.; HEYMSFIELD, A. J.; CHAN, K. R. The role of heterogeneous freezing nucleation in upper tropospheric clouds: Inferences from SUCCESS, **Geophys. Res. Lett.**, V. 25, p. 1387–1390, 1998.

DEMOTT, P. J.; SASSEN, K.; POELLOT, M. R.; BAUMGARDNER, D.; ROGERS, D. C.; BROOKS, S. D.; PRENNI, A. J.; KREIDENWEIS, S. M. African dust aerosols as atmospheric ice nuclei. **Geophys. Res. Lett.**, v. 30, n. 14, p. 1732, 2003.

DESPRÉS, V. R., et al. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: A review, **Tellus B**, V. 64, 2012

DESSENS, J. A physical evaluation of a hail suppression project with silver iodide ground burners in Southwestern France. **J. Appl. Meteorol.**, V. 37, n. 12, p. 1588–1599, 1998.

DESSENS, J.; SÁNCHEZ, J.L.; BERTHET, C.; HERMIDA, L.; MERINO, A. Hail prevention by ground-based silver iodide generators: Results of historical and modern field projects, **Atmospheric Research**, V. 170, p. 98-111, 2016.

DIEHL, K.; QUICK, C.; MATTHIAS-MASER, S.; MITRA, S. K. The ice nucleating ability of pollen Part I: Laboratory studies in deposition and condensation freezing modes, **Atmos. Res.**, V. 58, n.2, p. 75–87, 2001.

DSMZ, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH . Disponível em <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/dsm-20528.html>. Acesso em Junho/2017.

EASTWOOD, M. L.; CREMEL, S.; GEHRKE, C.; GIRARD, E.; BERTRAM, A. K. Ice nucleation on mineral dust particles: Onset conditions, nucleation rates and contact angles, **J. Geophys. Res.**, V. 113, 2008.

FALL A.L.; FALL R. “High-level expression of ice nuclei in *Erwinia herbicola* is induced by phosphate starvation and low temperature.”, **Current Microbiology**, V. 36, p. 370-376, 1998.

FANG, Z.; YAO, W.; LOU, X.; HAO, C.; GONG, C.; OUYANG, Z. Profile and characteristics of culturable airborne bacteria in Hangzhou, southeast of China. **Aerosol and Air Quality Research**, V. 16, n. 7, p. 1690–1700, 2016.

FEICHTER, J.; ROECKNER, E.; LOHMANN, U.; LIEPERT, B. Nonlinear aspects of the climate response to greenhouse gas and aerosol forcing, **J. Climate**, V. 17, p. 2384–2398, 2004.

FELIX, R. R. Análise das ocorrências de granizo na região sul do País e estudo de viabilidade para implementação de Sistemas anti-granizo em áreas afetadas. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Ambiental na UTFPR. 2015.

FLANNER, M. G.; ZENDER, C. S.; RANDERSON, J. T.; RASCH, P. J. Present-day climate forcing and response from black carbon in snow, **J. Geophys. Res.**, V. 112, 2007.

FLANNIGAN, M. D.; STOCKS, B. J. J.; WOTTON, B. M. M. **Climate Change and Forest Fires The Science of the Total Environment**, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20648808>>, acesso em Mai 2017.

GABRIC, A.; MURRAY, N.; STONE, L.; KOHL, M. Modeling the production of Dimethylsulfide during a phytoplankton bloom, **J. Geophys. Res.**, V. 98, p. 22805–22816, 1993.

GANDOLFI, I.; BERTOLINI, V.; AMBROSINI, R.; BESTETTI, G.; FRANZETTI, A. Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 4727–4736, 2013.

GAO, Y. et al. Temporal and spatial distributions of dust and its deposition to the China Sea. **Tellus**, V. 49B, p. 172–189, 1997.

GENEROSO, S.; BREON, F.M.; BALKANSKI, Y.; BOUCHER, O.; SCHULZ, M. Improving the seasonal cycle and interannual variations of biomass burning aerosol sources, **Atmos. Chem. Phys.**, V. 3, p. 1211–1222, 2003.

GILLETT, N. P.; WEAVER, A. J.; ZWIERS, F. W.; FLANNIGAN, M. D. Detecting the effect of climate change on Canadian forest fires, **Geophys. Res. Lett.**, V. 31, p. 18211, 2004.

GOLDSTEIN, A. H.; GALBALLY, I. E. Known and unexplored organic carbon constituents in the Earth's atmosphere, **Environ. Sci. Technol.**, V. 41, p. 1514–1521, 2007.

GRIFFIN, D. W.; GARRISON, V. H.; HERMAN, J. R.; SHINN, E. A. African desert dust in the Caribbean atmosphere: Microbiology and public health. **Aerobiologia**, v. 17, n. 3, p. 203–213, 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1011868218901>>.

GRIFFIN, D. W.; KELLOGG, C. A.; GARRISON, V. H.; LISLE, J. T.; BORDEN, T. C.; SHINN, E. A. Atmospheric microbiology in the northern Caribbean during African dust events. **Aerobiologia**, v. 19, n. 3–4, p. 143–157, 2003.

GU, L.; BALDOCCHI, D. D.; WOFSY, S. C.; MUNGER, J. W.; MICHALSKY, J. J.; URBANSKI, S. P.; BODEN, T. A. Response of a deciduous forest to the Mount Pinatubo eruption: enhanced photosynthesis, **Science**, V. 299, p. 2035–2038, 2003.

GU, L.; BALDOCCHI, D.; VERMA, S. B.; BLACK, T. A.; VESALA, T.; FALGE, E. M.; DOWTY, P. R. Advantages of diffuse radiation for terrestrial ecosystem productivity, **J. Geophys. Res.**, V. 107, n. 6, p. 4050, 2002.

HARRISON, F. C. Bacterial content of hailstones, **Bot. Gaz.**, V.26, n.3, p. 211–214, 1898.

HAYWOOD, J.; BOUCHER, O. Estimates of the direct and indirect radiative forcing due to tropospheric aerosols: A review, **Rev. Geophys.**, V. 38, p. 513–543, 2000.

HEALD, C. L.; SPRACKLEN, D. V. Atmospheric budget of primary biological aerosol particles from fungal sources, **Geophys. Res. Lett.**, V. 36, 2009

HEIDELBERG, J. F.; SHAHAMAT, M.; LEVIN, M.; RAHMAN, I.; STELMA, G.; GRIM, C.; COLWELL, R. R. Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3585–3588, 1997.

HENRI, C. The Sydney hailstorm: the insurance perspective. **Australian Journal of Emergency Management**, V. 14, p. 16-18, 2000.

HEYMSFIELD, A. J.; SABIN, R. M. Cirrus crystal nucleation by homogeneous freezing of solution droplets, **J. Atmos. Sci.**, V. 46, p. 2252– 2264, 1989.

HEYRMAN, Jeroen; RODRÍGUEZ-DÍAZ, Marina; DEVOS, Joke; FELSKÉ, Andreas; LOGAN, Niall A.; DE VOS, Paul. **Bacillus arenosi sp. nov., Bacillus arvi sp. nov. and Bacillus humi sp. nov., isolated from soil**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 55, p. 111-117, ago. 2004.

HOELZEMANN, J.; SCHULTZ, M.; BRASSEUR, G.; GRANIER, C.; SIMON, M. Global Wildland Fire Emission Model (GWEM): Evaluating the use of global area burnt satellite data, **J. Geophys. Res.**, V. 109, 2004.

HUSSEY, M. A; ZAYAITZ, A. **Endospore Stain Protocol**, American Society for Microbiology, 2007. Disponível em <http://www.asmscience.org/docserver/fulltext/education/protocol/protocol.3112.pdf?expires=1503515477&id=id&acname=guest&checksum=D1D45330654CD46587FC43C0549A9E27>. Acesso em Jul. 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse do Senso Demográfico 2010. Disponível em <http://censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?uf=42&dados=21>. Acesso em Jul 2017.

IPCC. Climate Change Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 p., 2014.

JAENICKE, R. Abundance of cellular material and proteins in the atmosphere, **Science**, V. 308, p. 73–73, 2005.

JAROSZWESKI, D.; HOOPER, E.; BAKER, C.; CHAPMAN, L.; QUINN, A. The impacts of the 28 June 2012 storms on UK road and rail transport, **Meteorological Applications**, V. 22, n. 3, p. 470, 2015.

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.

JONES, A. M.; HARRISON, R. M. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - A review. **Science of the Total Environment**, v. 326, n. 1–3, p. 151–180, 2004.

JOVEL, J.R. **Natural disasters and their economic and social impact**. Economic Commissions, Latin America and the Caribbean (CEPAL Review No. 38), Santiago, Chile. 1989.

KANZAWA, Y., A. HARADA, M. TAKEUCHI, YOLOTA, A.; HARADA, T. *Bacillus curdlanolyticus* sp. nov. and *Bacillus kobensis* sp. nov., which hydrolyze resistant curdlan. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 45, p. 515-521, 1995.

KÄRCHER, B.U; LOHMANN, A. parameterization of cirrus cloud formation: Homogenous freezing of supercooled aerosols, **J. Geophys. Res.**, V. 107, n. 2, 2002.

KELLOGG, C. A.; GRIFFIN, D. W.; GARRISON, V. H.; PEAK, K. K.; ROYALL, N.; SMITH, R. R.; SHINN, E. A. Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa. *Aerobiologia*, v. 20, p. 99–110. 2004.

KELLOGG, C. A.; GRIFFIN, D. W. Aerobiology and the global transport of desert dust.

**Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, n. 11, p. 638–644, 2006.

KHVOROSTYANOV, V.; K. SASSEN, Toward the theory of homogeneous nucleation and its parameterization for cloud models, **Geophys. Res. Lett.**, V. 25, p. 3155– 3158, 1998.

KNIGHT, N. C.; HEYMSFIELD, A. J. Measurement and Interpretation of Hailstone Density and Terminal Velocity. **Journal of the Atmospheric Sciences**, , v. 40, n.6, p. 1510-1516, 1983.

KOOP, T.; LUO, B. P.; TSIAS, A.; PETER, T. Water activity as the determinant for homogeneous ice nucleation in aqueous solutions, **Nature**, V. 406, p. 611– 614, 2000.

KRINNER, G.; BOUCHER, O.; BALKANSKI, Y. Ice-free glacial northern Asia due to dust deposition on snow, *Clim. Dynam.*, V. 27, p. 613–625, 2006.

KULMALA, M.; SUNI, T.; LEHTINEN, K. E. J.; DAL MASO, M.; BOY, M.; REISELL, A.; RANNIK, U.; AALTO, P.; KERONEN, P.; HAKOLA, H.; BACK, J.; HOFFMANN, T.; VESALA, T.; HARI, P. A new feedback mechanism linking forests, aerosols, and climate, **Atmos. Chem. Phys.**, V. 4, p. 557–562, 2004.

LANZ, V. A.; ALFARRA, M. R.; BALTENSPERGER, U.; BUCHMANN, B.; HUEGLIN, C.; PRÉVÔT, A. S. H. Source apportionment of submicron organic aerosols at an urban site by factor analytical modelling of aerosol mass spectra, **Atmos. Chem. Phys.**, V. 7, p. 1503–1522, 2007.

LEE, Jina; SHIN, Na-Ri; JUNG, Mi-Ja; WOON, Seong R.; KIM, Min-Soo; LEE, Jung-Sook; LEE, Keun C.; KIM, Young-Ok; BAE, Jin-Woo. **Paenibacillus oceanisediminis sp. nov. isolated from marine sediment.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Korea, v. 63, p. 428-434, 2013.

LESLIE, L.M.; LEPLASTRIER, M.; BUCKLEY, B.W. Estimating future trends in severe hail storms over the Sydney basin: A climate modelling study. **Atmospheric Research**, V. 87, n.1, p. 37-51, 2008.

LEWIS, E. R.; SCHWARTZ, S. E. **Sea salt aerosol production: mechanisms, methods, measurements, and models-A critical review.** Vol. 152. American geophysical union: 2004.

LIGHTHART, B. The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 23, p. 263–274, 1997.

LINDOW , S. E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. **Annual Review of Phytopatology**, v. 21, p. 363-384, 1983.

LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Distribution of ice-nucleation active bacteria on plants in nature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 831–838, 1978.

LOHMANN, U.; FEICHTER, J. Global indirect aerosol effects: a review, **Atmos. Chem. Phys.**, V. 5, p. 715–737, 2005.

LOHMANN, U. Possible aerosol effects on ice clouds via contact nucleation. **J. Atmos. Sci.**, v. 59, p. 647–656, 2002.

LOU, X.; FANG, Z.; SI, G. Assessment of culturable airborne bacteria in a university campus in Hangzhou, Southeast of China. **African Journal of Microbiology Research**, V. 6, n. 3, p. 665-673, 2012.

LUDLAM, F. H. The production of showers by the growth of ice particles. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, v. 78, n. 338, p. 543–553, 1952.

MACKLIN, W. C.; STRAUCH, E.; LUDLAM, F. H. The density of hailstones collected from a summer storm, *Nubila*, v. 3, p. 12. 1960

MADIGAN, M. T. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2010. xxxii, 1128 p. ISBN 9788536320939.

MALKAROVA, A. Estimation of physical efficiency of hail protection accounting for changes in hail climatology. **Russ. Meteorol. Hydrol.**, V. 36, n.6, p. 392–398, 2011.

MANDRIOLI, P.; PUPPI, G. L.; BAGNI, N.; PRODI, F. Distribution of microorganisms in hailstones, **Nature**, V. 246, p. 416–417, 1973.

MARCONI, M.; SFERLAZZO, D. M.; BECAGLI, S.; BOMMARITO, C.; CALZOLAI, G.; CHIARI, M.; DI SARRA, A.; GHEDINI, C.; GÓMEZ-AMO, J. L.; LUCARELLI, F.; MELONI, D.; MONTELEONE, F.; NAVA, S.; PACE, G.; PIACENTINO, S.; RUGI, F.; SEVERI, M.; TRAVERSI, R.; UDISTI, R. Saharan dust aerosol over the central Mediterranean Sea: PM10 chemical composition and concentration versus optical columnar measurements, **Atmos. Chem. Phys.**, V.14, p. 2039-2054, 2014.

MARTINS, J. A.; BRAND, V. S.; CAPUCIM, M. N.; FELIX, R. R.; MARTINS, L. D.; FREITAS, E. D.; GONÇALVES, F. L. T.; HALLAK, R.; DIAS, M. A. F. S.; CECIL, D. J. Climatology of destructive hailstorms in Brazil. **Atmospheric Research**, v. 184, p. 126–138, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosres.2016.10.012>>.

MASON, B. J.; MAYBANK, J. Ice-nucleating properties of some natural mineral dusts. **Q.J.R. Meteorol. Soc.**, V. 84, p. 235–241, 1958.

MCMEEKING, G. R.; BART, M.; CHAZETTE, P.; HAYWOOD, J. M.; HOPKINS, J. R.; MCQUAID, J. B.; MORGAN, W. T.; RAUT, J.C.; RYDER, C. L.; SAVAGE, N.; TURNBULL, K.; COE, H. Airborne measurements of trace gases and aerosols over the London metropolitan region, **Atmos. Chem. Phys.**, V. 12, p. 5163–5187, 2012.

MEOLA, M.; LAZZARO, A.; ZEYER, J. Bacterial Composition and Survival on Sahara Dust Particles Transported to the European Alps. **Frontiers in Microbiology**, V. 6, p. 1454, 2015.

MERINO, A.; GARCÍA-ORTEGA, E.; LÓPEZ, L.; SÁNCHEZ, J.; GUERRERO-HIGUERAS, A. Synoptic environment, mesoscale configurations and forecast parameters for hailstorms in southwestern Europe., **Atmos. Res.**, V.122, p. 183–198, 2013.

MESINGER, F.; MESINGER, N. Has hail suppression in Eastern Yugoslavia led to a reduction in the frequency of hail?, **J. Appl. Meteorol.**, V. 31, p. 104–111, 1992.

MICHAUD, A. B.; DORE, J. E.; LESLIE, D.; LYONS, W. B.; SANDS, D. C.; PRISCU, J. C. Biological ice nucleation initiates hailstone formation, **J. Geophys. Res. Atmos.**, V. 119, n. 12, p. 186–197, 2014.

MIRCEA, M.; FACCHINI, M. C.; DECESARI, S.; CAVALLI, F.; EMBLICO, L.; FUZZI, S.; VESTIN, A.; RISSLER, J.; SWIETLICKI, E.; FRANK, G.; ANDREAE, M. O.; MAENHAUT, W.; RUDICH, Y.; ARTAXO, P. Importance of the organic aerosol fraction for modeling aerosol hygroscopic growth and activation: a case study in the Amazon Basin, **Atmos. Chem. Phys.**, V. 5, p. 3111-3126, 2005.

MÖHLER, O.; P. J. DEMOTT; G. VALI; Z. LEVIN. Microbiology and atmospheric processes: The role of biological particles in cloud physics. **Biogeosciences**, V.4, n. 6, p.1059-1071, 2007. MOHR, S.; KUNZ, M.; GEYER, B. Hail potential in Europe based on a regional climate model hindcast. **Geophys. Res. Lett.** V. 42, n. 24, p.904-910, 2015.

MONTES, M. J.; MERCADÉ, E.; BOZAL, N.; GUINEA, J. *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1521–1526, 2004.



MORRIS C.E.; GEORGAKOPOULOS D.G.; SANDS D.C. Ice Nucleation Active Bacteria and Their Potential Role in Precipitation. **J. Phys.** V. 4, 2004.

MORRIS, C. E.; et al. Microbiology and atmospheric processes: research challenges concerning the impact of airborne micro-organisms on the atmosphere and climate. **Biogeosciences**, V. 8, p. 17-25, 2011.

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

Munich Re, 1999: Topics 2000—**Natural Catastrophes**, The Current Position (published statistics updated by Munich Re to reflect adjustments for 1999 year-end loss accounting). Munich Reinsurance Group, Geoscience Research Group, Munich, Germany, 126 pp.

MURRAY, B. J.; JENSEN, E. J. Homogeneous nucleation of amorphous solid water particles in the upper mesosphere. **Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics**, v. 72, n. 1, p. 51–61, 2010.

NAKAYA U; TERADA, T. Simultaneous observations of the mass, falling velocity and form of individual snow crystals. *J. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. 2*, v. 1, p. 191, 1935.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 548–572, 2000.

O'DOWD, C. D; SMITH, M. H. Physicochemical properties of aerosols over the Northeast Atlantic – Evidence for wind-speedrelated submicron sea-salt aerosol production. **J. Geophys. Res.**, V. 98, p.1137–1149, 1993.

OH, H-W; KIM, B-C; LEE, K. H.; KIM, D. Y.; PARK, D-S.; PARK, H-M.; BAE, K. S. *Paenibacillus camelliae* sp. nov., isolated from fermented leaves of *Camellia sinensis*. **The Journal of Microbiology, Korea**, V. 46, n. 5, p. 530-534, 2008.

ORRISON, L. H.; CHERRY, W. B.; TYNDALL, R. L.; FLIERMANS, C. B.; GOUGH, S. B.; LAMBERT, M. A.; MCDUGAL, L. K.; BIBB, W. F.; BRENNER, D. J. *Legionella oakridgensis*: unusual new species isolated from cooling tower watert. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 536-545, 1983.

PARASCHIVESCU, M.; STEFAN, S.; BOGDAN, M. Verification of an algorithm (DWSR 2500C) for hail detection. **Atmosfera** V.24, n. 4, p.417–433, 2011.

PIERCE, J. R; ADAMS, P. J. Global evaluation of CCN formation by direct emission of sea salt and growth of ultrafine sea salt. **J. Geophys. Res.** V. 111, 2006.

PINTI, V.; C. MARCOLLI; B. ZOBRIST; C. R. HOYLE; AND T. PETER. Ice nucleation efficiency of clay minerals in the immersion mode. **Atmos. Chem. Phys. Discuss.** V.12, n. 1, p. 3213 - 3261, 2012.

POČAKAL, D.; VEČENAJ, Ž.; ŠTALEC, J. Hail characteristics of different regions in continental part of Croatia based on influence of orography. **Atmos. Res.** V.93, n. 1-3, p. 516-525, 2009.

PÖSCHL, U. Rainforest aerosols as biogenic nuclei of clouds and precipitation in the Amazon. **Science**, V. 329 , p.1513-1516, 2010.

PROSPERO, J.M. et al. Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, v. 21, p. 1–19, 2005.

PRUPPACHER, H. R.; KLETT, J. D. **Microphysics of Clouds and Precipitation**. Dordrecht, Holanda: D. Reidel Publishing Company, 1980

PRUPPACHER, H. R.; KLETT, J. D. **Microphysics of Clouds and Precipitation**. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers, 1997.

PUNGE, H.J.; KUNZ, M. Hail observations and hailstorm characteristics in Europe: A review. **Atmospheric Research**. V. 159, p.176-177, 2016.

RAKOVEC, J; GREGORCIC, B.; KRANJC, A.; MEKINDA, T.; KAJFEŽ-BOGATAJ, L. Some evaluations of hail suppression system efficiency in Slovenia, Yugoslavia. **Theor. Appl. Climatol.** V.41, n. 3, p.157-171, 1990.

RIVAS, R.; GUTIÉRREZ, C.; ABRIL, A.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VENTOSA, A.; VELÁZQUEZ, E. *Paenibacillus rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Cicer arietinum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1305–1309, 2005a.

RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. *Paenibacillus xylanilyticus* sp. nov., an airborne xylanolytic bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 405–408, 2005b.

RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 743–746, 2005c.

ROBERTS, P.; HALLETT, J. A laboratory study of the ice nucleating properties of some mineral particulates. **Q.J.R. Meteorol. Soc.**, V. 94, p. 25-34, 1968.

ROGERS, J. S.; STALL, R. E.; BURKE, M. J. Low-temperature conditioning of the ice nucleation active bacterium, *Erwinia herbicola*. **Cryobiology**, v. 24, n. 3, p. 270–279, 1987.

ROMANO I.; LAMA, L.; NICOLAUS, B.; POLI, A.; GAMBACORTA, A.; GIORDANO, A. *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis* subsp. nov., an alkalitolerant halophile isolated from an algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy), and emended description of *Oceanobacillus oncorhynchi*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, V. 56, p. 805-810, 2006.

ROSINSKI, J; KNIGHT, C. A.; NAGAMOTO, C. T.; MORGAN, G. M.; KNIGHT N. C. Further studies of large, water-insoluble particles within hailstones. **Journal of Atmospheric Sciences**. V. 36, p. 882-891, 1979.

SAMBROOK, Joseph; FRITSCH, Edward. F.; MANIATIS, Tom. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Illustrated edition. 2 ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SÁNCHEZ, M. M.; FRITZE, D.; BLANCO, A.; SPRÖER, C.; TINDALL, B. J.; SCHUMANN, P.; KROPPESTEDT, R. M.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. J. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 935–939, 2005.

ŠANTL-TEMKIV, T.; FINSTER K; HANSEN B. M.; NIELSEN N. W.; KARLSON U. G. The microbial diversity of a storm cloud as assessed by hailstones, **FEMS Microbiol. Ecol**. V. 81, n. 3, p.684–695, 2012.

ŠANTL-TEMKIV, T.; FINSTER K.; DITTMAR T.; HANSEN B. M.; THYRHAUG R.; NIELSEN N. W.; KARLSON U. G. Hailstones: A window into the microbial and chemical inventory of a storm cloud., **PLoS One**, V. 8(1), 2013.

SASSEN, K.; BENSON S. Ice nucleation in cirrus clouds: A model study of the homogeneous and heterogeneous modes. **Geophys. Res. Lett.** V.27, p.521– 524, 2000.

SCHALLER, R. C.; FUKUTA, N. **Ice Nucleation by Aerosol Particles: Experimental Studies Using a Wedge-Shaped Ice Thermal Diffusion Chamber** *Journal of the Atmospheric Sciences*, 1979.

SCHIPPERS, Axel; BOSECKER, Klaus; SPRÖER, Cathrin; SCHUMANN, Peter. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, V. 55, p. 655-660, 2005.

SCHLEIFER, K. H.; KLOOS, W. E. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and . **Int.J.Syst.Bacteriol.**, v. 25, n. 1, p. 50–61, 1975.

SHAFFER, A. B. T.; LIGHTHART, B. Survey of Culturable Airborne Bacteria at Four Diverse Locations in Oregon: Urban, Rural, Forest, and Coastal. **Microbial Ecology**, v. 34, p. 167–177, 1997.

SHEN, F.; YAO, M. Are We Biologically Safe with Snow Precipitation? A Case Study in Beijing. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

SHEN, J. H.; KLIER K.; ZETTLEMOYER C. A. Ice nucleation by micas, **J. Atmos. Sci.**, V. 34, p. 957–960, 1977.

SIMEONOV, P. An overview of crop hail damage and evaluation of hail suppression efficiency in Bulgaria. **J. Appl. Meteorol.** V.35, p.1574–1581, 1996.

SIOUTAS, M.; FLOCAS, H. Hailstorms in northern Greece: synoptic patterns and thermodynamic environment. **Theor. Appl. Climatol.** V. 75 (3), p.189–202, 2003.

SIOUTAS, M.; MEADEN, T.; WEBB, J.D. Hail frequency, distribution and intensity in northern Greece. **Atmos. Res.** V.93 (1-3), p.526–533, 2009.

SLONCZEWSKI, J. L.; FOSTER, J. W. (ed.). **Microbiology an envolving science**. 2. ed. New York: Norton & Company, 2011.

ŠMERDA, J.; SEDLÁČEK, I.; PÁČOVÁ, Z.; DURNOVÁ, E.; SMÍŠKOVÁ, A.; HAVEL, L. *Paenibacillus mendelii* sp. nov., from surface-sterilized seeds of *Pisum sativum* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 2351–2354, 2005.

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.

THIELEN, J.; GADIAN, A. Influence of topography and urban heat island effects on the outbreak of convective storms under unstable meteorological conditions: a numerical study. **Meteorol. Appl.** V. 4, n. 2, p.139–149, 1997.

TOMINAGA, T.; AN, S-Y.; OYAIZU, H.; YOKOTA, A. *Sporosarcina luteola* sp. nov. isolated from soy sauce production equipment in Japan. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, V. 55, p. 217-223, 2009.

TURNER, M.A.; ARELLANO, F.; KOZLOFF, L. M. Components of Ice Nucleation Structures of Bacteria. **Journal of Bacteriology**, V.173, p. 6515-6527, 1991.

UNIVERSIDADE DE CORNELL. Disponível em <<https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores>>. Acesso em: mai. 2017.

URBANO, R.; PALENIK, B.; GASTON, C. J.; PRATHER, K. A. Detection and phylogenetic analysis of coastal bioaerosols using culture dependent and independent techniques. **Biogeosciences**, v. 8, n. 2, p. 301–309, 2011.

VALI, G.; CHRISTENSEN, M.; FRESH, R. W.; GALYAN, E. L.; MAKI, L. R.; SCHNELL, R. C. **Biogenic Ice Nuclei. Part II: Bacterial Sources** **Journal of the Atmospheric Sciences**, 1976. .

VALI, G.; DEMOTT, P. J.; MÖHLER, O.; WHALE, T. F. Technical Note: A proposal for ice nucleation terminology. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 15, n. 18, p. 10263–10270, 2015.

VELÁZQUEZ, E.; DE MIGUEL, T.; POZA, M.; RIVAS, R.; ROSSELLÓ-MORA, R.; VILLA, T. G. *Paenibacillus favisporus* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 59–64, 2004.

VITTORI, O; DI CAPORIACCO, G. The density of hailstones. *Nubila*, 2, p. 51, 1959.

VOLKAMER, R.; JIMENEZ, J. L.; SAN MARTINI, F.; DZEPINA, K.; ZHANG, Q.; SALCEDO, D.; MOLINA, L. T.; WORSNOP, D. R.; MOLINA, M. J. Secondary organic aerosol formation from anthropogenic air pollution: Rapid and higher than expected, **Geophys Res. Lett.** V. 33, 2006.

WANG, Pao K. *Physics and Dynamics of Clouds and Precipitation*. Cambridge University Press, 2013. Disponível em <https://books.google.com.br/books?id=zukfAwAAQBAJ&pg=PA434&dq=wANG+2004+HAIL+SHAPE+MICROPHYSICS&hl=ptPT&sa=X&ved=0ahUKEwiw6vXezu3VAhUJiJAKHRdMCWoQ6AEIJzAA#v=onepage&q=wANG%202004%20HAIL%20SHAPE%20MICROPHYSICS&f=false..> Acesso em Jun. 2017.

WARREN, S. G; WISCOMBE, W. J. A model for the spectral albedo of snow. II: Snow containing atmospheric aerosols. **J. Atmos. Sci.**, V. 37, p. 2734–2745, 1980.

WEBER, R. J.; SULLIVAN, A. P.; PELTIER, R. C.; RUSSELL, A.; YAN, B.; ZHENG, M.; DE GOUW, J.; WARNKE, C.; BROCK, C.; HOLLOWAY, J. S.; ATLAS, E. L.; AND EDGERTON, E. A study of secondary organic aerosol formation in the anthropogenic influenced southeastern United States, **J. Geophys. Res.**, V. 112, D13302, 2007.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, v. 19, p. 7256-7260, 1986.

WOMACK, A. M.; BOHANNAN, B. J. M.; GREEN, J. L. Biodiversity and biogeography of the atmosphere. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences**, v. 365, p. 3645–3653, 2010.

WOODHOUSE, M. T.; MANN, G. W.; CARSLAW, K. S.; AND BOUCHER, O. New Directions: The impact of oceanic iron fertilization on cloud condensation nuclei, **Atmos. Environ.** V.42, p. 5728–5730, 2008.

YAMADA, K.; KOMAGATA, K. Taxonomic Studies on Coryneform Bacteria IV. Morphological Cultural, Biochemical, and Physiological Characteristics. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 416, n. 18, p. 399–416, 1972.

YAMAN, F.; AKTAŞ, B.; TOURAY, M.; ÇOBAN, E. P.; B., HALIL, H. Biodiversity of Bacteria Isolated from Different Soils. **International Journal of Secondary Metabolite**, V. 4, p. 27-34, 2016.

YANKOFISKY, S. a.; LEVIN, Z.; BERTOLD, T.; SANDLERMAN, N. Some Basic Characteristics of Bacterial Freezing Nuclei. **Journal of Applied Meteorology**, 1981.

YOON, J-H.; KIM, I-G.; KANG, K. H.; OH, T-K.; PARK, Y-H. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, V. 53, p. 1297-1303, 2003.

YOON, J. H.; KANG, S. J.; YEO, S. H.; OH, T. K. *Paenibacillus alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 2339–2344, 2005.

YU, Y. et al. *Sporosarcina antarctica* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Antarctic. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 58, p.2114-2117, 2008.

ZHANG, J.; WU Y.; C.L. LIU C. L.; Z.B. SHEN; Y. ZHANG. Major Components of Aerosols in North China: Desert Region and the Yellow Sea in the Spring and Summer of 1995 and 1996. **J. Atmos. Sci.**, 59, 1515–1532, 2002.

ZHANG, K. M; WEXLER, A. S. Evolution of particle number distributions near roadways Part I: Analysis of aerosol dynamics and its implication for engine emissions measurement. **Atmos. Environ.**, V.38, p.6643–6665, 2004.

ZIMMERMANN, F.; S. WEINBRUCH; L. SCHÜTZ; H. HOFMANN, M; EBERT, K. KANDLER; A. WORRINGEN. Ice nucleation properties of the most abundant mineral dust phases. **J. Geophys. Res.**, V. 113, D23204, 2008.

## APÊNDICES

Apêndice 01 - Tabela de dados binários utilizada no software UPGMA.

AMOSTRAS	PONTO: BJ-KIOSK																				
	FORMA		BORDA		COR					Brilhante x Fosco		Translúcido x Opaco		MORFOLOGIA			GRAM		Produção de Esporos		
	circular	irregular	irregular	lisa	nspar	branco	amarela	creme	laranja	ambar	brilhante	Fosco	opaco	transl	bacilo	cocos	filam	gram +	gram -	sim	não
KI-A01	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1
KI-A02	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
KI-A04	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A06	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
KI-A07	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A09	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
KI-A10	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
KI-A11	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
KI-A12	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A13	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
KI-A15	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
KI-A16	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A17	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
KI-A18	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A21	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
KI-A22	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
KI-A23	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
KI-A24	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A25	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
KI-A26	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A27	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A29	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A30 B	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
KI-A31	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
KI-A32	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
KI-A33	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1
KI-A34	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1
KI-A35	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
KI-A36	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
KI-A37	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
KI-A38	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A39	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A40	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
KI-A41	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A42	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A43	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A44	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
KI-A46	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
KI-A47	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A48	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A49	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
KI-A51	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
KI-A52	±	θ	θ	±	θ	±	θ	θ	θ	θ	±	±	θ	±	θ	θ	CANCELADO				
KI-A53	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
BJ-06-A01	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-11-A01	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-11-A02	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
BJ-11-A04	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-11-A05	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-11-A06	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
BJ-EST-A01	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-EST-A03	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-EST-A05	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
BJ-EST-A06	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
BJ-EST-A07	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-EST-A08	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-EST-A09	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-EST-A10	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BJ-EST-A12	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1





PONTO: BJ-06																												
AMOSTRAS	FORMA		BORDA		ELEVAÇÃO			PIGMENTAÇÃO					SUPERFÍCIE		DENSIDADE			DIÂMETRO (mm)			MORFOLOGIA			GRAM		Produção de Esporos		N° UFC (mL <sup>-1</sup> ) Semelhantes
	Circular	Irregular	Rugosa	Lisa	Plano	Côncavo	Convexo	Transpa-rente	Branco	Amarelo	Creme	Laranja	Âmbar	Brilhante	Fosco	Opaco	Transl.	0 <x≤1	1<x≤5	x>5	Bacilo	Cocos	Filam	Gram +	Gram -	Sim	Não	
BJ.06-A01	x	-	-	x	x	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	x	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	x	20
BJ.06-A02*	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	-	-	-	x	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	10
BJ.06-A03*	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	-	-	-	x	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	20
BJ.06-A04*	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	x	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	20
Total	4	0	2	2	4	0	0	0	0	1	3	0	0	3	1	4	0	0	0	4	1	0	0	1	0	0	1	60

PONTO: BJ-11																												
AMOSTRAS	FORMA		BORDA		ELEVAÇÃO			PIGMENTAÇÃO					SUPERFÍCIE		DENSIDADE			DIÂMETRO (mm)			MORFOLOGIA			GRAM		Produção de Esporos		N° UFC (mL <sup>-1</sup> ) Semelhantes
	Circular	Irregular	Rugosa	Lisa	Plano	Côncavo	Convexo	Transpa-rente	Branco	Amarelo	Creme	Laranja	Âmbar	Brilhante	Fosco	Opaco	Transl.	0 <x≤1	1<x≤5	x>5	Bacilo	Cocos	Filam	Gram +	Gram -	Sim	Não	
BJ.11-A01	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	x	20
BJ.11-A02	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	-	-	x	x	-	-	x	-	-	x	10
BJ.11-A03*	x	-	-	x	-	-	x	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	x	-	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	10
BJ.11-A04	-	x	x	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	x	10
BJ.11-A05	-	x	x	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	x	10
BJ.11-A06	x	-	x	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-	x	-	-	s/d	s/d	s/d	-	x	-	-	x	320	
Total	4	2	5	1	5	0	1	0	3	0	2	1	0	4	2	5	1	0	1	4	4	1	0	5	0	0	5	380

PONTO: BA-ESTRADA																													
AMOSTRAS	FORMA		BORDA		ELEVAÇÃO			PIGMENTAÇÃO					SUPERFÍCIE		DENSIDADE			DIÂMETRO (mm)			MORFOLOGIA			GRAM		Produção de Esporos		N° UFC (mL <sup>-1</sup> ) Semelhantes	
	Circular	Irregular	Rugosa	Lisa	Plano	Côncavo	Convexo	Transpa-rente	Branco	Amarelo	Creme	Laranja	Âmbar	Brilhante	Fosco	Opaco	Transl.	0 <x≤1	1<x≤5	x>5	Bacilo	Cocos	Filam	Gram +	Gram -	Sim	Não		
BA-EST-A01	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	x	150	
BA-EST-A02*	x	-	-	x	x	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	x	-	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	50	
BA-EST-A03	x	-	-	x	-	-	x	-	-	-	x	-	-	x	-	x	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	20		
BA-EST-A04*	-	x	x	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	-	-	-	x	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	10	
BA-EST-A05	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	-	-	x	-	-	-	x	-	-	x	0	
BA-EST-A06	x	-	-	x	x	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	x	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	10		
BA-EST-A07	x	-	-	x	x	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	x	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	20		
BA-EST-A08	-	x	x	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	x	10	
BA-EST-A09	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	-	x	10	
BA-EST-A10	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	x	10	
BA-EST-A11*	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	s/d	s/d	10
BA-EST-A12	x	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	x	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	-	x	10	
BA-EST-A13	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	x	-	-	-	x	-	-	x	-	-	s/d	s/d	10	
Total	11	2	6	7	11	0	2	0	1	2	7	2	1	7	6	11	2	0	8	5	9	1	0	9	1	0	9	320	

Nota: \* Isolados não considerados na realização do dendrograma, por não apresentarem dados suficientes.  
s/d – sem dados