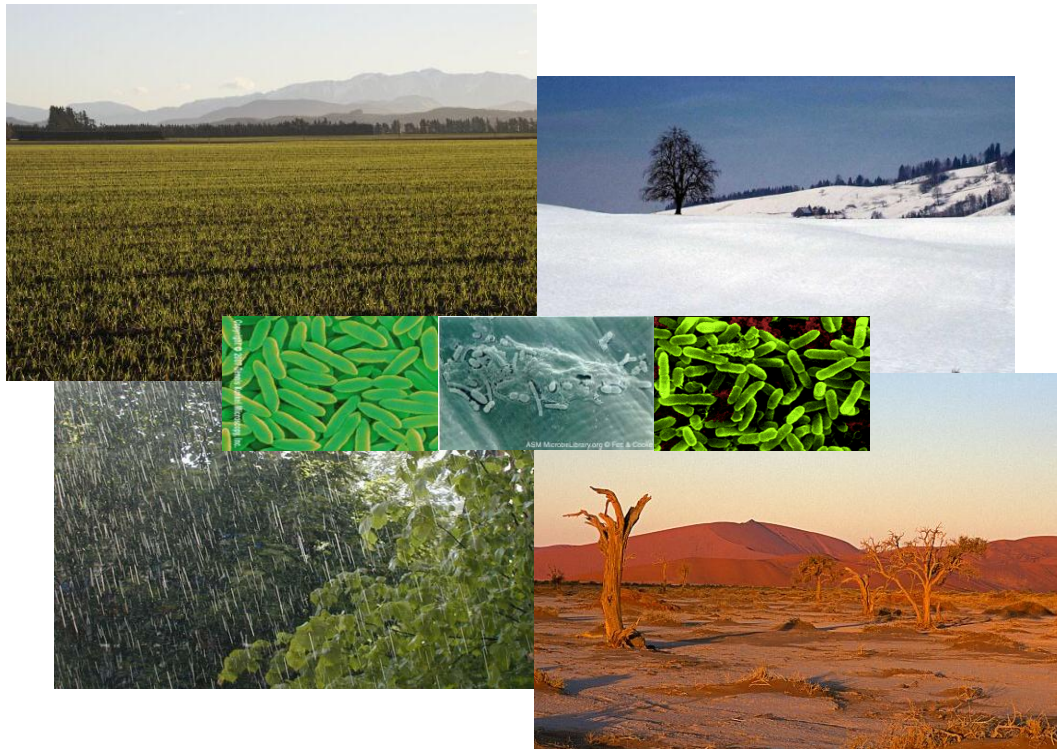


# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

## ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διασπορά παγοπυρηνωτικών βακτηρίων στο περιβάλλον

Ιωάννης Φυντάνης



ΑΘΗΝΑ 2014

## Εξεταστική Επιτροπή

Δ. Γεωργακόπουλος,	Επικ. Καθηγητής
Ι. Χατζηπαυλίδης,	Επικ. Καθηγητής
Α. Ταμπακάκη,	Επικ. Καθηγητής
Κ. Φασέας,	Καθηγητής
Π. Χατζόπουλος,	Καθηγητής

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	
3.1. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΠΑΓΟΠΥΡΗΝΩΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	3
3.1.1. Προέλευση και εξάπλωση των παγοπυρηνωτικών μικροοργανισμών..	4
3.1.2. Ιδιότητες σχετικές με γεωργικές πρακτικές.....	7
3.1.3. Ο ρόλος των μη γεωργικών θύκων.....	8
3.1.4. Βακτηριακή παγοπυρήνωση .....	10
3.1.5. Πρακτικές εφαρμογές των βακτηριακών πυρήνων πάγου .....	13
3.2. ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΠΑΓΟΠΥΡΗΝΩΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΚΛΙΜΑΤΟΣ.....	18
3.2.1. Επιστημονικό υπόβαθρο και αιτιολόγηση.....	25
3.2.2. Εργαστηριακές μελέτες της παγοπυρήνωσης από βιολογικά μόρια...	27
3.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΓΟΠΥΡΗΝΩΣΗΣ .....	30
3.3.1. Δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης INA .....	30
3.3.2. Ασυνήθιστα μοτίβα της εξέλιξης του βακτηριακού γονιδίου παγοπυρήνωση .....	39
3.3.3. Εφαρμογές των βακτηριακών πυρήνων πάγου.....	41
3.4. Σκοπός της μελέτης .....	43
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	
4.1. Καταμέτρηση πληθυσμών ολικών και παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε περιβαλλοντικά δείγματα από διαφορετικά ενδιαιτήματα.. .....	44
4.2. Βακτηριακά Στελέχη:απομόνωση και καλλιέργεια. ....	46
4.3. Δοκιμή παγοπυρήνωσης των στελεχών της συλλογής.. .....	46
4.4. Δοκιμή οξειδάσης των στελεχών της συλλογής.....	47
4.5. Αντίδραση υπερευαισθησίας των στελεχών της συλλογής σε φύλλα καπνού της ποικιλίας Turkish.....	48
4.6. Δοκιμή αντιορρών έναντι πρωτεΐνης INA για παρατήρηση βακτηρίων με ανοσοφθορισμό.. .....	48
4.7. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη.....	50
4.8. Ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών διαφόρων γονιδίων Ina.....	50

4.9. Απομόνωση ολικού DNA από περιβαλλοντικό δείγμα για ανίχνευση γονιδίων Ipa.....	54
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	
5.1. Καταμέτρηση πληθυσμών ολικών και παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε περιβαλλοντικά δείγματα από διαφορετικά ενδιαιτήματα.....	59
5.2. Βιοχημικές δοκιμές βακτηριακών στελεχών της συλλογής.....	59
5.3. Δοκιμή αντισώματων έναντι της πρωτεΐνης INA για παρατήρηση βακτηρίων με ανοσοφθορισμό.....	62
5.4. Ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών διαφόρων γονιδίων Ipa.....	63
5.5. Απομόνωση ολικού DNA από περιβαλλοντικό δείγμα για ανίχνευση γονιδίων Ipa.....	73
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	74
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ .....	
10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΣΥΝΤΑΓΩΝ.....	

## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.

Τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια περιλαμβάνουν φυτοπαθογόνα είδη όπως το *Pseudomonas syringae*, ένα βακτήριο παγκόσμιας οικονομικής σημασίας που προκαλεί νεκρώσεις σε φύλλα, μίσχους, φρούτα και άλλα εναέρια φυτικά μέρη. Τα βακτήρια αυτά δρουν ως πυρήνες που καταλύουν τον σχηματισμό πάγου από νερό σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες, λίγο κάτω από τους 0°C.

Το *P. syringae* είναι ένας από τους λίγους μικροοργανισμούς γνωστούς για τη διασπορά τους ακόμα και στα νέφη, ενώ έχει βρεθεί σε σταγόνες βροχής και στο χιόνι.

Έχει προταθεί ότι το *P. syringae* και άλλα παγοπυρηνωτικά βακτήρια μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στη διαμόρφωση του κλίματος με την υποκίνηση του νετού στα νέφη μέσω της παγοπυρηνωτικής τους δραστηριότητας. Το *P. syringae* που αρχικά μελετήθηκε για την ικανότητά του να προκαλεί ασθένεια στα φυτά, μας έδειξε ότι αυτή του η ικανότητα δεν είναι παρά μια πτυχή της συμπεριφοράς του. Το βακτήριο αυτό μπορεί να βρεθεί πάνω σε υγιή φύλλα και να αναπτύσσεται και να επιβιώνει για πολλές γενιές ως επίφυτο.

Η ζημία παγετού στις σοδείες είναι ένα σοβαρό πρόβλημα που μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση της παραγωγής. Τέτοια ζημία μπορεί να εμφανιστεί σε θερμοκρασίες ελαφρώς κάτω από τους 0°C λόγω της παρουσίας παγοπυρηνωτικών βακτηρίων. Η παρουσία παγοπυρηνωτικών βακτηρίων μπορεί να καθορίσει εάν τα φυτά βλέπτονται σοβαρά σε περιόδους χαμηλών θερμοκρασιών (-2 μέχρι -10°C) που ειδάλλως δεν θα ήταν επιβλαβείς.

Εάν αυτά τα βακτήρια διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στην κατακρήμνιση και οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτό συμβαίνει μπορούν να ποσοτικοποιηθούν, τότε οι δυνάμεις από τις οποίες παράγονται στην ατμόσφαιρα θα μπορούσαν μια ημέρα να χρησιμοποιηθούν σε μία προσπάθεια να αλλάξουν τις διαδικασίες σχηματισμού νεφών προς εφαρμογές όπως ο μετριασμός της ξηρασίας. Η κατανόηση αυτών των διαδικασιών θα μπορούσε επίσης να δώσει ενδείξεις για το ρόλο άλλων βιολογικών πυρήνων πάγου, όπως η γύρη, στις ατμοσφαιρικές διαδικασίες.

## 2. ABSTRACT.

The ice nucleating bacteria include phytopathogenic species as *Pseudomonas syringae*, a bacterium of global economic importance that causes necrosis on leaves, stems, fruits and other aerial plant parts. These bacteria act as nuclei which catalyze the formation of ice from water at relatively high temperatures just below 0°C.

The *P. syringae* is one of the few microorganisms known for its spreading even in the clouds and has been found in raindrops and in the snow.

It has been suggested that *P. syringae* and other ice nucleating bacteria may play a role in the configuration of the climate with the instigation of precipitation in clouds through their ice nucleating activity. The *P. Syringae* that was originally studied for its ability to cause disease in plants, showed us that this ability is only one aspect of its behavior. This bacterium can be found on healthy leaves and grow and survive for many generations as an epiphyte.

The frost damage in crops is a serious problem that can cause a significant decrease in production. Such damage can occur at temperatures slightly below 0°C due to the presence of ice nucleating bacteria. The presence of ice nucleating bacteria can determine if the plants will be seriously damaged during the low temperature periods (-2 to -10°C) that otherwise would not be harmful.

If these bacteria play a catalytic role in precipitation and the mechanisms by which this occurs can be quantified, then the forces by which they are produced in the atmosphere could one day be used in an attempt to change the cloud formation processes for applications such as the mitigation of drought. An understanding of these procedures could also give clues about the role of other biological ice nuclei, such as pollen, in atmospheric processes.

### 3.1. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΠΑΓΟΠΥΡΗΝΩΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.

Τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια περιλαμβάνουν φυτοπαθογόνα είδη όπως το *Pseudomonas syringae*, ένα βακτήριο παγκόσμιας οικονομικής σημασίας που προκαλεί νεκρώσεις σε φύλλα, μίσχους, φρούτα και άλλα εναέρια φυτικά μέρη. Τα βακτήρια αυτά δρουν ως πυρήνες που καταλύουν τον σχηματισμό πάγου από νερό σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες, λίγο κάτω από τους 0°C (6). Αυτό το βακτήριο μπορεί να εδραιώσει μεγάλους πληθυσμούς στις εναέριες επιφάνειες ενός ευρέος φάσματος φυτικών ειδών χωρίς απαραίτητως να προκαλέσει ασθένεια (1). Από αυτή την επιφυτική φάση μπορεί να διασπαρεί μέσω αερολυμάτων. Η ανοδική μετακίνηση του *P. syringae* είναι ένα σημαντικό μονοπάτι για τη διασπορά του, με καθαρή ανοδική ροή από τις φυτικές κόμμες, της τάξης των 10<sup>5</sup> κυττάρων ανά τετραγωνικό μέτρο ανά ώρα (2). Το *P. syringae* είναι ένας από τους λίγους μικροοργανισμούς γνωστούς για τη διασπορά τους ακόμα και στα νέφη (3, 4), ενώ έχει βρεθεί σε σταγόνες βροχής (5) και στο χιόνι (158). Τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια απαντώνται όμως σε διάφορους θώκους, εκτός των φυτών. Το *P. syringae* έχει απομονωθεί από το νερό λιμνών, ακόμα και σε αλπικές περιοχές, μακριά από γεωργικές ή άλλες ανθρωπογενείς δραστηριότητες, καθώς και σε ρέματα και ποταμούς που τροφοδοτούνται από τη βροχή ή την τήξη του χιονιού. Έχει επίσης βρεθεί σε επιλίθους ποταμών (βιοφίλμ σε βράχους που αποτελούνται συνήθως από φύκη, διάτομα, τροχόζωα, βακτήρια και νηματώδεις) (Morris paper, surprising niche...). Ο συνδυασμός συνεχούς υγρασίας και η διαθεσιμότητα φωτοσυνθετών από τα φύκη ίσως να προσφέρει τη βάση για έναν πρώτο βιότοπο κατάλληλο για επιβίωση και ανάπτυξη του *P. syringae*. Με την απορροή, ίσως καταλήγει τελικά σε γεωργικές περιοχές, αποτελώντας έτσι μία πηγή μόλυσματος για αποικισμό και προσβολή καλλιεργούμενων φυτών. Τα ποσοστά ροής μικρών ρεμάτων (περίπου 1 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>) θα μπορούσαν να φέρουν σχεδόν 10<sup>5</sup> *P. syringae* κάθε ημέρα πάνω από βράχους, σε μία δεδομένη τοποθεσία, σε ένα ρέμα εάν το νερό περιείχε έστω και ένα κύτταρο αυτού του βακτηρίου ανά m<sup>3</sup> (146). Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, φαίνεται ότι το *P. syringae* επιζεί, διαδίδεται και πολλαπλασιάζεται σε ένα ευρύ φάσμα βιοτόπων και θώκων, χρησιμοποιώντας τον παγκόσμιο κύκλο του νερού. Έχει μάλιστα προταθεί ότι το *P. syringae* και άλλα παγοπυρηνωτικά βακτήρια μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στη διαμόρφωση του κλίματος με την υποκίνηση του

υετού στα νέφη μέσω της παγοπυρηνωτικής τους δραστηριότητας (7). Στις επόμενες ενότητες αναπτύσσονται οι διάφορες πλευρές της βιολογίας των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων, στο κάθε ενδιαίτημα όπου διαβιούν και συζητείται η πιθανή συμμετοχή τους στη διαμόρφωση του κλίματος.

### 3.1.1. Προέλευση και εξάπλωση των παγοπυρηνωτικών μικροοργανισμών.

Οι συνολικές συγκεντρώσεις όλων των βακτηριακών κυττάρων στην ελεύθερη τροπόσφαιρα είναι ιδιαίτερα μεταβλητές ( $10 - 1000 \text{ L}^{-1}$ ) (8). Η μεγάλη πλειοψηφία αυτών των αερομεταφερόμενων κυττάρων είναι ζωντανά και μη καλλιεργήσιμα (10), εν μέρει εξ αιτίας της αποξήρανσης και της έκθεσης στο υπεριώδες φως. Οι προηγούμενες εκτιμήσεις αριθμού μικροοργανισμών στην ατμόσφαιρα ήταν πολύ χαμηλότερες και προέρχονταν από τον υπολογισμό μόνο των καλλιεργήσιμων κυττάρων, τα οποία αποτελούν μια μικρή μειονότητα (περίπου το 0.1%) (9).

Μερικά από τα αερομεταφερόμενα βακτήρια είναι γνωστό ότι παγοπυρηνώνουν. Ένα είδος βακτηρίων που συναντάται συχνά, το *P. syringae*, που αναπτύσσεται στην φυτική επιφάνεια έχει φανεί ότι έχει παγοπυρηνωτικές ιδιότητες (π.χ. 2, 11, 12, 13, 14). Στα μεσοδυτικά των ΗΠΑ (Βόρεια και Νότια Ντακότα, Ουισκόνσιν, Κάνσας) τα φυτοπαθογόνα *P. syringae* ταλαιπωρούν καλλιέργειες σίτου και κριθαριού, από τη δεκαετία του '70. Τα κύτταρα των *P. syringae* μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγάλους αριθμούς στα φυτά στη δροσερή πρωίμη εποχή ανάπτυξης. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να διασκορπιστούν στην ατμόσφαιρα από τα φύλλα. Φαίνεται όμως ότι αυτή η οριζόντια μεταφορά περιορίζεται σε αποστάσεις ενός έως λίγων μέτρων και αφορά μικρούς αριθμούς βακτηρίων (5). Διαφορετικά στελέχη έχουν ένα μεταβαλλόμενο φάσμα παγοπυρηνωτικής ικανότητας, με παγοπυρηνωτικά κλάσματα να εκτείνονται σε έξι τάξεις μεγέθους (π.χ. 14). Επιπλέον, υπάρχουν βιολογικά στοιχεία ότι τα *P. syringae* ακολουθούν στενά τον κύκλο του νερού (15, 16). Η απομόνωση του ίδιου κλώνου από προσβολές ολόκληρων φυτειών, από λίμνες που χρησιμοποιούνται για την άρδευση και από φρέσκο χιόνι, επεξηγεί την ανακύκλωση αυτού του βακτηρίου μεταξύ των πηγών εδάφους και της ατμόσφαιρας. Τα εμφανή χαρακτηριστικά γνωρίσματα των βακτηρίων συνοψίζονται γενικά από τους Morris et al. (7).

Όλοι οι γνωστοί παγοπυρηνωτικοί μικροοργανισμοί συνδέονται με φυτά. Αυτοί περιλαμβάνουν τα βακτήρια *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas viridiflava*, *Xanthomonas campestris* pathovar *translucens*, *Pantoea*



*agglomerans*. καθώς επίσης και τον φυτοπαθογόνο μύκητα, *Fusarium* (F.) *avenaceum* (7). Εκτός από το *P. syringae*, οι Amato et al. (17) έχουν αναφέρει την απομόνωση του *F. avenaceum* από τα νέφη σε ύψος περίπου 1450m στην κεντρική Γαλλία. Το κλίμα καθορίζει τις επίγειες πηγές των παγοπυρηνωτικών βακτήρια με διάφορους τρόπους. Ο εξαιρετικά μεγάλος αριθμός των φύλλων που παράγονται από χερσαία και υδρόβια φυτά παρέχουν ενδιαιτήματα καταλλήλα για αποικισμό από ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών. Το βακτηριακό μέρος των φυλλικών μικροβιακών κοινοτήτων, με έμφαση στο *Pseudomonas syringae*, έχει μελετηθεί αρκετά. Μεταξύ των βακτηρίων που αποικίζουν τα φύλλα, κανένα δεν έχει λάβει μεγαλύτερη προσοχή από ό,τι το *P. syringae*, ως ο πρώτος ανασυνδυασμένος οργανισμός (Ice- *P. syringae*) που σκόπιμα εισάχθηκε στο περιβάλλον. Τα φυλλικά οικοσυστήματα είναι δυναμικά και εφήμερα. Το φυσικό περιβάλλον των μικροβίων που ζουν στη φυλλόσφαιρα αλλάζει συνεχώς με καθημερινούς κύκλους στη θερμοκρασία, την ακτινοβολία, τη σχετική υγρασία, την ταχύτητα του ανέμου, και την υγρασία των φύλλων. Ελαφρώς πιο μακροπρόθεσμοι κύκλοι παρατηρούνται με το πέρασ των καιρικών συστημάτων και οι εποχιακή κλιματικές αλλαγές επιβάλλουν έναν ακόμα μεγαλύτερο κύκλο. Τα φυσικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων αλλάζουν καθώς μεγαλώνουν, ωριμάζουν, γηράσκουν και μαζί τους αλλάζει και η φαινολογία τους ως ξενιστής. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη των πληθυσμών του *P. syringae* πάνω στα φύλλα. Το *P. syringae* που αρχικά μελετήθηκε για την ικανότητά του να προκαλεί ασθένεια στα φυτά μας έδειξε ότι αυτή του η ικανότητα δεν είναι παρά μια πτυχή της συμπεριφοράς του. Το βακτήριο αυτό μπορεί να βρεθεί πάνω σε υγιή φύλλα και να αναπτύσσεται και να επιβιώνει για πολλές γενιές ως επίφυτο (159). Παρατηρήσεις της βακτηριακής ανάπτυξης επάνω στα φύλλα, συμπεριλαμβανομένου και του *P. syringae*, συμπυκνώθηκαν σε ένα μοντέλο από τους Caristi et al., (18). Προέβλεψε ότι η ανάπτυξη των πληθυσμών του *P. syringae* στις φυλλικές επιφάνειες εξαρτώνται από το χρόνο που το φύλλο παραμένει υγρό μετά τη βροχή ή τη δροσιά (περίοδος στεγνώματος). Δευτερευόντως, μόνο εντός συγκεκριμένου εύρους θερμοκρασίας (π.χ. μεταξύ 2 και 32°C, Caristi et al.) (20) παρατηρείται ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού. Το ποσοστό της εξαρτάται εκθετικά από τη θερμοκρασία, και οι αποκλίσεις στην τάξη μεγέθους της συγκέντρωσης των κυττάρων φαίνεται ότι ακολουθούν τον ημερήσιο κύκλο της θερμοκρασίας του επιφανειακού αέρα. Εκτός αυτού του εύρους θερμοκρασίας, τα βακτήρια βρίσκονται είτε σε κατάσταση αναστολής ζωτικότητας γνωστής ως

διάπαυση (21) είτε μπορεί να θανατωθούν συνολικά, σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι Lindow et al. (12) παρατήρησαν ότι συγκεντρώσεις των καλλιεργήσιμων παγοπυρηνωτικών βακτηρίων στα φύλλα των φυτειών αυξάνονται εκθετικά με το χρόνο κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού στο Ουισκόνσιν, μέχρι περίπου 4 τάξεις μεγέθους. Τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια ήταν περίπου το 1% του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων, αλλά αυτό το κλάσμα βρέθηκε ότι είναι επίσης μεταβλητό (2). Οι μέσες συγκεντρώσεις των αερομεταφερόμενων βακτηρίων φάνηκε ότι αυξάνονταν εκθετικά με τη θερμοκρασία στη Μεγάλη Βρετανία από τους Harrison et al. (8). Παρατηρήθηκαν αποκλίσεις στην τάξη μεγέθους μεταξύ των τεσσάρων εποχών σε σχετικές συνεισφορές διαφόρων γενών, όπως το *Pseudomonas*. Τέλος, η ταχύτητα του ανέμου επίσης διαμορφώνει τις βακτηριακές συγκεντρώσεις (8).

Οι πυρήνες πάγου βιολογικής προέλευσης στο φρέσκο χιόνι ήταν περίπου 50 φορές περισσότεροι σε αυτό που συλλέχθηκε από τις περιοχές της ενδοχώρας των ΗΠΑ και της Ευρώπης σε σύγκριση με το χιόνι που συλλέχθηκε στην Ανταρκτική (22). Αυτό προσφέρει επί πλέον υποστήριξη για την γενική σημασία των μαζών εδάφους στις οποίες αναπτύσσονται φυτά, ως η αρχική πηγή προέλευσης βακτηριακών και άλλων βιολογικών παγοπυρηνωτών στην ατμόσφαιρα.

Αντίθετα, μικροοργανισμοί που απομονώνονται από υδάτινα περιβάλλοντα κοντά σε θαλάσσιο πάγο στις πολικές περιοχές επιδεικνύουν μια ασυνήθιστη απουσία παγοπυρηνωτικής δραστηριότητα στις θερμοκρασίες στις οποίες το νερό της θάλασσας μπορεί να υπερψυχρανθεί (21). Εάν αυτές οι απομονώσεις είναι αντιπροσωπευτικές της πλειοψηφίας των μικροοργανισμών σε τέτοια πολικά περιβάλλοντα, τότε αυτό υποδειλώνει ότι η αποφυγή σχηματισμού του πάγου μπορεί να είναι μια από τις στρατηγικές προσαρμογής και επιβίωσης στο κρύο για τα βακτήρια θαλάσσιου πάγου. Αυτό το ακραίο παράδειγμα επεξηγεί πόσο γενικά, στη γη, ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να έχουν εξελίξει μια ενισχυμένη ή κατεσταλμένη παγοπυρηνωτική ικανότητα σύμφωνα με το εάν αυτή παρέχει πλεονέκτημα ή όχι για την επιβίωση στη δοσμένη θέση. Πράγματι, η ικανότητα για επιβίωση των βακτηρίων σε παγωμένα περιβάλλοντα πρέπει να αφορά σε μια κρίσιμη πτυχή των συστημάτων της βιόσφαιρας (21). Ένα μεγάλο μέρος της γήινης επιφάνειας καλύπτεται περιοδικά με πάγο κατά τη διάρκεια του παγετώδους κύκλου σε βάθος γεωλογικού χρόνου, παρ'όλα αυτά, μορφές ζωής έχουν προσαρμοστεί επιτυχώς σε τέτοιες δυσμενείς συνθήκες.

Η αερομεταφερόμενη διασπορά είναι ένα βασικό στάδιο του κύκλου ζωής πολλών μικροοργανισμών, που καθορίζει μερικώς τη γεωγραφική διανομή τους. Κατά την εξέλιξη των μικροοργανισμών όπως τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια, η προσαρμογή τους στις ατμοσφαιρικές συνθήκες επηρέασε πιθανώς τη δομή του γονιδιώματός τους (22). Για παράδειγμα, η παγοπυρήνωση των σωματιδίων των νεφών από (π.χ. παγοπυρηνωτικά) βακτήρια παρέχει έναν σαφή μηχανισμό για την επιστροφή τους στη γήινη επιφάνεια. Η παγοπυρηνωτική ικανότητα των βακτηρίων πιθανά να έχει εξελιχθεί σε απάντηση πιέσεων επιλογής. Τέτοια επιλογή, σχετική με την αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών με τις ατμοσφαιρικές συνθήκες, εξερευνάται στον αναδυόμενο τομέα της βιο-μετεωρολογίας.

### 3.1.2. Ιδιότητες σχετικές με γεωργικές πρακτικές.

Οι βασικές φαινοτυπικές ιδιότητες των *P. syringae* έχουν ως εξής: παράγουν μια φθορίζουσα χρωστική ουσία στο μέσο απομόνωσης, είναι αρνητικά στην αντίδραση οξειδάσης, δεν υδρολύουν την αργινίνη υπό αναερόβιες συνθήκες και υδρολύουν την εσουλίνη (147).

Το *P. syringae* είναι ανθεκτικό σε φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των βακτηριακών ασθενειών των φυτών όπως ο θειικός χαλκός και αντιβιοτικά που περιλαμβάνουν την στρεπτομυκίνη, την καναμυκίνη, τη γενταμυκίνη, την οξυτετρακυκλίνη και το οξολυνικό οξύ (23, 24). Η εφαρμογή αυτών των βιοκτόνων μπορεί να επιβάλει μια πίεση επιλογής στους γηγενείς πληθυσμούς του *P. syringae* με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε πολύ υψηλές δόσεις αυτών των σκευασμάτων. Χαρακτηριστικές ποσοότητες αυτών των αντιβιοτικών στις οποίες τα στελέχη του *P. syringae* επιδεικνύουν ανθεκτικότητα είναι τα 50 mg L<sup>-1</sup> στρεπτομυκίνης και τα 10 mg L<sup>-1</sup> οξυτετρακυκλίνης, καναμυκίνης και γκενταμυκίνης. Καμία άλλη αντιβιοτική αντίσταση σε αντιβιοτικά δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από μη γεωργικές περιοχές, όπως από τους επίλιθους και κανένα στέλεχος δεν ήταν ανθεκτικό στο θειικό άλας χαλκού. Είναι ενδιαφέρον ότι στελέχη με το μέγιστο φάσμα ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά απομονώθηκαν από τον ποταμό Auzon στη Γαλλία και όχι από περιοχές των ΗΠΑ όπου τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρύτερα για τον έλεγχο των φυτικών ασθενειών.

Στελέχη που έχουν συλλεχθεί από επίλιθους ποταμών έχουν κατηγοριοποιηθεί σε οκτώ γενετικές ομάδες με 95% ομοιότητα στις 16S rDNA αλληλουχίες (147). Η σύνθεση αυτών των ομάδων προτείνει δύο θεμελιώδεις πτυχές της βιολογίας των *P. Syringae*. Κατ' αρχάς, ότι συγκεκριμένοι γονότυποι του *P. syringae* απαντώνται ευρέως γεωγραφικά. Έχει προταθεί ότι είναι διαδεδομένη η μετανάστευση γενετικών ομάδων και για άλλες ψευδομονάδες όπως το *P. stutzeri* (25), αλλά δεν έχει προταθεί κανένας συγκεκριμένος μηχανισμός μετανάστευσης. Μέσω της αερομεταφερόμενης διασποράς, το *P. syringae* έχει μεταφερθεί στα νέφη σε ύψη αρκετών χιλιομέτρων και έχει ανιχνευθεί επίσης στη βροχή όπως αναφέρεται ανωτέρω. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ενεργά παγοπυρηνωτικά στελέχη του *P. syringae* διευκολύνουν την κατακρήμνισή τους από την ατμόσφαιρα καταλύοντας την ψύξη του νερού των νεφών και στη συνέχεια του χιονιού και των βροχοπτώσεων (7, 26). Ένα τέτοιο μεταφορικό μέσο θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεγάλης απόστασης διασπορά. Αυτό το βακτήριο μπορεί επίσης να διασπαρεί σε συνδυασμό με μεταφερόμενους φυτικούς ιστούς (μοσχεύματα, σπόροι, τμήματα). Σαν επίφυτο των φυτών που αναπτύσσεται σε αυτούς τους ιστούς, θα μπορούσε τελικά να εκπλυθεί στους ποταμούς όπως έχει παρατηρηθεί για άλλα παθογόνα φυτικά βακτήρια (27). Αυτό το μέσο διασποράς θα ήταν αναμενόμενο να κρατήσει το βακτήριο στις γεωργικές ζώνες ή στα νερά που απομακρύνονται από τις γεωργικές ζώνες. Σύμφωνα με τα παραπάνω περιοχές με γεωργική δραστηριότητα δίνονται να ευθύνονται για την παρουσία παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε περιοχές συμπεριλαμβανομένων τοποθεσιών, αδιάφθορων από τον πολιτισμό, μακριά από τις γεωργικές ζώνες.

Υπάρχει σαφής αντιστοιχία μεταξύ των γενετικών ομάδων και των φαινοτύπων. Αυτό προτείνει ότι η οριζόντια μεταφορά γονιδίων είναι σπάνια μεταξύ αυτών των γενετικών ομάδων του *P. syringae*. Συγκεκριμένα, στελέχη που ήταν παθογόνα σε ένα ή περισσότερα από τα φυτικά είδη που δοκιμάστηκαν ήταν σε διαφορετικές γενετικές ομάδες από τα στελέχη που δεν ήταν παθογόνα.

### 3.1.3. Ο ρόλος των μη γεωργικών θώκων.

Το *P. syringae* θεωρείται ένα ιδιαίτερα κλωνικό είδος όσον αφορά το γονιδίωμά του. Η ποικιλομορφία προκύπτει από τη συσσώρευση κινητών γενετικών στοιχείων όπως είναι τα νησιά παθογένειας. (28).

Οι ποτάμιοι επίλιθοι έχει αποδειχθεί ότι είναι μια ευνοϊκή περιοχή για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων για άλλα βακτήρια (29) και μπορεί επίσης να διαδραματίζουν αυτό το ρόλο για τα *P. syringae*.

Συνολικά, τα όρια της κατανόησής μας της ιστορίας της ζωής αυτού του βακτηριακού φυτοπαθογόνου διευρύνονται. Διάφορα ευρύματα προτείνουν την πιθανή σημασία των μη γεωργικών θάκων και των θάκων που δε σχετίζονται με τα ανώτερα φυτά στην ιστορία της ζωής των *P. syringae*. Ενώ δεν είναι γνωστό ποιά γνωρίσματα είναι επωφελή για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των *P. syringae* στους ποτάμιους επίλιθους, δίνεται έμφαση στη δυνατότητα που δίνουν αυτά τα γνωρίσματα, να επηρεάσουν την καλή κατάσταση των παθογόνων στους γεωργικούς βιότοπους. Επιπλέον, αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την ευρεία γεωγραφική διασπορά ορισμένων γενών των *P. syringae*. Ενώ η σημασία αυτών των επιλιθικών στελεχών είναι άγνωστη για τη γεωργία, έχουν βρεθεί στελέχη που έχουν παθογόνο ικανότητα παρόμοια με τα καλά μελετημένα στελέχη αναφοράς των *P. syringae* που έχουν απομονωθεί από προσβεβλημένα καλλιεργούμενα φυτά (30). Ως εκ τούτου, τα *P. syringae* από ποτάμιους επίλιθους σε μη γεωργικούς βιότοπους διατηρούν τη φυτοπαθογένειά τους. Περαιτέρω διορατικότητα στο βαθμό στον οποίο υπάρχει επικάλυψη των επιλίθιων και των γεωργικών πληθυσμών, και ειδικά στη συχνότητα ανταλλαγής μεταξύ αυτών των βιότοπων, είναι κρίσιμη για την κατανόηση της πιθανής σημασίας αυτών των μη γεωργικών θάκων στη ζωή των φυτοπαθογόνων πληθυσμών των *P. syringae*. Η έρευνα για τις απαντήσεις αυτών των ερωτήσεων θα απαιτήσει τη συγκριτική γενετική πληθυσμών, βασισμένη σε μια καθορισμένη με σαφήνεια στρατηγική δειγματοληψίας για να διασφαλιστεί η επαρκής αντιπροσώπευση των διαφορετικών θάκων και οι τρόποι ζωής των *P. syringae*, για την αποφυγή της υπερεκπροσώπισης των στελεχών που επικρατούν στις επιδημίες.

Ο ρόλος των μη γεωργικών θάκων, παρά την πιθανή σημασία τους στην ιστορία εξέλιξης των φυτοπαθογόνων έχει αγνοηθεί κατά ένα μεγάλο μέρος. Για τα φυτοπαθογόνα βακτήρια, η σχέση τους με τα ανώτερα φυτά και ιδιαίτερα με τα καλλιεργούμενα, αντιπροσωπεύει μια σύντομη περίοδο της εξελικτικής ιστορίας τους. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός των μη γεωργικών θάκων είναι πιθανό να παρέχει διορατικότητα στην οικολογία και την εξελικτική βιολογία αυτών των βακτηρίων. Επιπλέον, οι μη γεωργικοί θάκων μπορούν να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη γεωργικών επιδημιών, τόσο ως πηγές εμβολίων όσο και ως πηγές νέων γνωρισμάτων που μπορούν να ενισχύσουν τη βακτηριακή παθογένεια ή την

επιθετικότητα στους φυτικούς ξενιστές καθώς επίσης και στη γενική φυσική τους κατάσταση. Απαιτείται μια περιεκτική εικόνα της εξελικτικής ιστορίας των φυτοπαθογόνων για να κατανοηθούν πλήρως οι εκλεκτικές δυνάμεις που διαπλάθουν τη δομή και την εξέλιξη των γονιδιωμάτων αυτών των μικροοργανισμών.

#### 3.1.4. Βακτηριακή παγοπυρήνωση.

Η ζημία παγετού στις σοδείες είναι ένα σοβαρό πρόβλημα που μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση της παραγωγής. Παραδείγματος χάριν, ένας πρόωρος παγετός τον Αύγουστο του 1983 μείωσε την απόδοση καρπού σε μέρη των λιβαδιών των καναδικών κεντρικών επαρχιών από 15 μέχρι 25%. Τέτοια ζημία μπορεί να εμφανιστεί σε θερμοκρασίες ελαφρώς κάτω από τους 0°C λόγω της παρουσίας παγοπυρηνωτικών βακτηρίων (34). Η παρουσία παγοπυρηνωτικών βακτηρίων μπορεί να καθορίσει εάν τα φυτά βλάπτονται σοβαρά σε περιόδους χαμηλών θερμοκρασιών (-2 μέχρι -10°C) που ειδάλλως δεν θα ήταν επιβλαβείς. Σύμφωνα με τους Gross et al. (35), η θερμοκρασία στην οποία εμφανίζεται ο σχηματισμός πάγου εξαρτάται από την παρουσία ενεργών πυρήνων πάγου, και τη θερμοκρασία στην οποία οι πυρήνες είναι ενεργοί. Τα φυλλοβόλα οπωροφόρα δέντρα είναι ιδιαίτερα τρωτά στον τραυματισμό παγετού στις θερμοκρασίες μεταξύ των -2 και των -5°C κατά τη διάρκεια του σταδίου της άνθισης και μετά την άνθιση (36). Ο βαθμός στον οποίο τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια αυξάνουν τη θερμοκρασία στην οποία ο ευαίσθητος στον παγετό ιστός των οφθαλμών των λουλουδιών μπορεί να υπεψυχρανθεί μπορεί να αυξήσει την ευπάθεια των ιστών στον τραυματισμό από παγετό. Για να αποδώσουμε έναν τέτοιο ρόλο στα παγοπυρηνωτικά βακτήρια, εντούτοις, οι οφθαλμοί των λουλουδιών υπερψύχονται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (δηλ. -7°C) χωρίς τραυματισμό απουσία μεγάλων πληθυσμών των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων (35).

Τα βακτήρια αποδείχθηκε αρχικά ότι ενεργούν ως παγοπυρηνωτικοί παράγοντες από τους Maki et al. (37). Διαπίστωσαν ότι καθώς η συγκέντρωση των κυττάρων *P. syringae* αυξανόταν, οι θερμοκρασίες στις οποίες εμφανιζόταν ψύξη ήταν υψηλότερες. Οι Arny et al. (38), έδειξαν ότι η ευαισθησία στη ζημία παγετού στο καλαμπόκι αυξήθηκε μετά από εφαρμογή *P. syringae* στα φύλλα. Σύμφωνα με τους Lindow et al. (39) και Kaneda (34), τα *P. syringae* και άλλα επιφυτικά βακτήρια έχει βρεθεί ότι υποκινούν τη ζημία παγετού σε πολυάριθμα φυτικά είδη και καλλιέργειες.

Ένας μοναδιαίος πυρήνας πάγου αρκεί για να αρχίσει ο σχηματισμός πάγου και ο συνακόλουθος τραυματισμός παγετού σε ολόκληρα φύλλα, φρούτα και λουλούδια, ανάλογα με το βαθμό περιορισμού της διάδοσης πάγου μέσα στο φυτό (40).

Τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια που βρίσκονται συνήθως στα φυτά περιλαμβάνουν στελέχη διάφορων ειδών που παράγουν μια πρωτεΐνη ικανή να πυρηνώσει το πάγωμα σε θερμοκρασίες τόσο υψηλές όσο και τους  $-1^{\circ}\text{C}$ . Εντούτοις, η παρουσία παγοπυρηνωτικών βακτηρίων δεν εξηγεί καθολικά την παγοπυρήνωση στα φυτά. Τα μεγέθη των παγοπυρηνωτικών βακτηριακών πληθυσμών ποικίλλουν πολύ μεταξύ των φυτικών ειδών, της τοποθεσίας, των κλιμάτων και των εποχών και μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων σε έναν πληθυσμό είναι αποτελεσματικοί πυρηνωτές (41). Ο Lindow υποστήριξε ότι ένας πολύ μικρός πληθυσμός των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων θα μπορούσε να πυρηνώσει το πάγωμα σε ολόκληρα δέντρα εσπεριδοειδών καθώς μόλις πυρηνωνόταν θα διαδιδόταν γρήγορα. Εντούτοις, αυτό το επιχείρημα δεν ευσταθεί στα ποώδη φυτά, όπου κάθε φύλλο (στις χλόες) ή κύριος βλαστός (σε ένα δικοτυλίδο) παγώνει χωριστά λόγω της υψηλότερης θερμοκρασίας της στεφάνης έναντι των φύλλων (42, 43).

Τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια προωθούν τις ζημίες παγετού στα τέλη του φθινοπώρου, το χειμώνα και την άνοιξη, και εάν είναι παθογόνα μπορούν να αρχίσουν την προσβολή μετά από μια μαζική αύξηση της επαφής με το φυτικό ιστό ή το ράγισμα του φλοιού. Λίγες μελέτες έχουν δείξει μέχρι τώρα, εντούτοις, ότι ο τραυματισμός παγετού στα ξύλινα πολυετή όπως η ιτιά και η λεύκα (52, 53, 54, 55) μπορεί να προκληθεί από παγοπυρηνωτικά βακτήρια ή ότι είναι μέρος της ανάπτυξης του βακτηριακού έλκους (56, 57, 58). Έρευνα στη Σουηδία και άλλες εκθέσεις (59, 39, 60, 52, 58), υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα παθογόνα βακτήρια με παγοπυρηνωτικές ιδιότητες θα μπορούσαν να είναι ένας σοβαρός παράγοντας πρόκλησης ζημίας, σχετικής με τον παγετό, σε ξυλώδη φυτά επίσης.

Η δυνατότητα που έχουν ορισμένα βακτηριακά είδη να καταλύουν το σχηματισμό πάγου αφορά ένα συναρπαστικό φαινόμενο, τόσο με πρακτικές όσο και επιστημονικές εφαρμογές. Η βακτηριακή παγοπυρήνωση αντιπροσωπεύει μια ασυνήθιστη περίπτωση μετάβασης από την υγρή στη στερεή φάση που μπορεί να καταλυθεί από μια βιολογική οντότητα. Το φαινόμενο της βακτηριακής παγοπυρήνωσης αρχικά παρατηρήθηκε σε στελέχη του *Pseudomonas syringae* το 1974 (45). Μετέπειτα, στελέχη των βακτηρίων *Erwinia herbicola* (44), *Pseudomonas fluorescens* (46), *Pseudomonas viridiflava* (47), και *Xanthomonas campestris* pathovar

*translucens* (48) καταδείχθηκε ότι έχουν τη δυνατότητα να καταλύσουν το σχηματισμό πάγου σε υπέρψυχρο νερό. Αν και η βακτηριακή παγοπυρήνωση προφανώς περιορίζεται σε αυτά τα αρνητικά κατά Gram είδη, η ευρέως διαδεδομένη παρουσία πολλών από αυτά τα είδη σε φυτά και σε άλλα φυσικά ενδιαίτηματα κάνει τη βακτηριακή παγοπυρήνωση ένα κοινό φαινόμενο στη φύση. Ο ρόλος αυτών των μοναδικών καταλυτών στη δημιουργία πάγου και των πρακτικών εφαρμογών τους θα εξεταστεί για να καταδείξει τη σημασία τους στις βιολογικές και φυσικές διαδικασίες. Εργασίες ανασκόπησης έχουν αναπτύξει την κατανόησή μας της μοριακής βάσης της παγοπυρήνωσης (49-51).

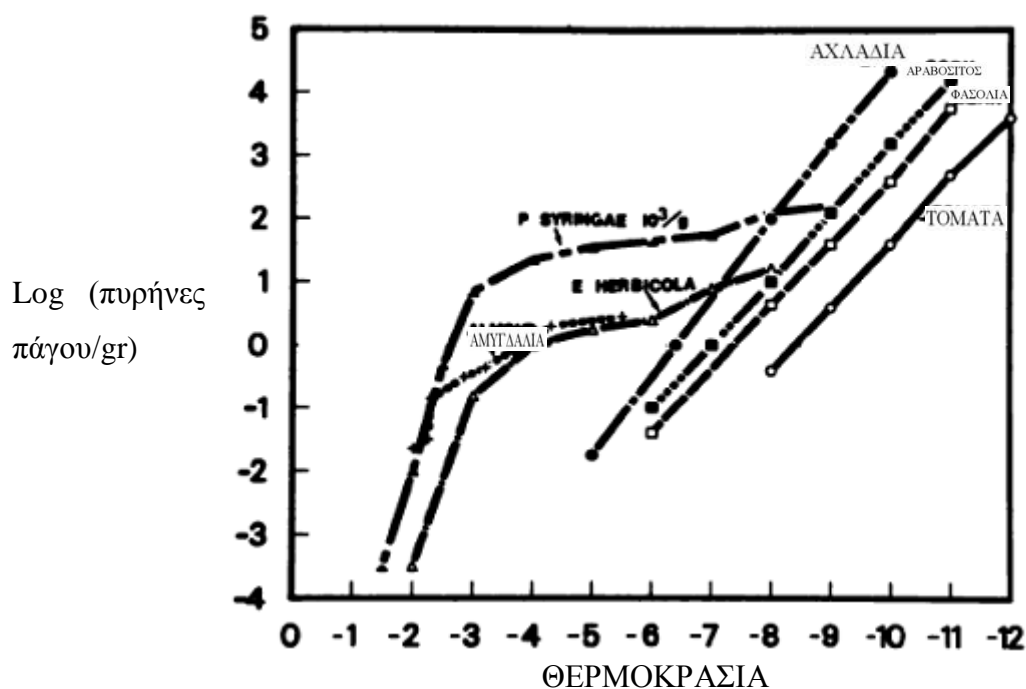
Ένα ενδιαφέρον γνώρισμα της βακτηριακής παγοπυρήνωσης είναι η ποσοτική και ποιοτική μεταβλητότητά της. Ένας πληθυσμός κυττάρων ενός δεδομένου ενεργού παγοπυρηνωτικού στελέχους περιέχει πυρήνες πάγου που είναι ενεργοί ως καταλύτες πάγου σε υπέρψυχρο νερό σε θερμοκρασίες από τους  $-2^{\circ}\text{C}$  έως τους  $-12^{\circ}\text{C}$  (61-63). Εντούτοις κάθε βακτηριακό κύτταρο δεν αποτελεί και ένα πυρήνα πάγου. Οι πυρήνες πάγου υψηλής θερμοκρασίας τείνουν να είναι σπάνιοι σε έναν πληθυσμό κυττάρων. Παραδείγματος χάριν, συνήθως λιγότερο από το  $10^{-6}$  όλων των κυττάρων σε μία καλλιέργεια περιέχει πυρήνες πάγου ενεργούς σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τους  $-2^{\circ}\text{C}$  (63). Οι ενεργοί πυρήνες πάγου σε χαμηλότερες θερμοκρασίες είναι συνήθως περισσότεροι από εκείνους που είναι ενεργοί σε υψηλότερες θερμοκρασίες (62, 63). Ακόμη και σε πολύ ενεργές καλλιέργειες, εντούτοις, σε μία δεδομένη στιγμή, δεν περιέχει πυρήνα πάγου κάθε κύτταρο. Είναι ασαφές εάν αυτό αντιπροσωπεύει ένα "στιγμιότυπο" μιας δυναμικής κατάστασης μέσω της οποίας τα κύτταρα εκφράζουν μόνο παροδικά παγοπυρηνωτική δραστηριότητα, ή εάν μόνο ένα μικρό υποσύνολο του πληθυσμού των κυττάρων παράγει έναν λειτουργικό πυρήνα πάγου. Όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες υποδεικνύουν ότι η πρώτη υπόθεση είναι σωστή. Μικρές αλλαγές στο περιβάλλον των κυττάρων, όπως η αυξομείωση της θερμοκρασίας και η σύνθεση και διαφοροποίηση στο χρόνο διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών όπως το άζωτο, ο άνθρακας, ο φωσφόρος και το θείο, μπορούν να αναγκάσουν προσχηματισμένα μόρια πρωτεΐνης παγοπυρήνωσης στα κύτταρα να συγκροτήσουν περιοχές παγοπυρήνωσης στην κυτταρική μεμβράνη (64, 65, 148). Διαφορετικά στελέχη ενός βακτηριακού είδους διαφέρουν στη δυνατότητά τους να παράγουν πυρήνες πάγου (66). Παραδείγματος χάριν, υπάρχει μια λογαριθμική κατανομή της συχνότητας παραγωγής των πυρήνων πάγου μεταξύ μιας μεγάλης συλλογής στελεχών του *Pseudomonas syringae* (66). Σε μερικά στελέχη, σχεδόν κάθε βακτηριακό



κύτταρο είναι παγοπυρηνωτικά ενεργό στους  $-10^{\circ}\text{C}$ . Σε άλλα στελέχη, λιγότερα από ένα σε κάθε  $10^7$  κυττάρων είναι ενεργά σε αυτήν την θερμοκρασία. Οι πυρήνες πάγου που είναι ενεργοί σε υψηλές, κάτω του σημείου πήξης, θερμοκρασίες έχουν προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στη βακτηριακή παγοπυρήνωση. Λόγω της δυνατότητάς τους να παράγουν πυρήνες πάγου σε υψηλές θερμοκρασίες (ενεργοί πυρήνες πάγου στους  $-5^{\circ}\text{C}$  ή και υψηλότερα), τα παγοπυρηνωτικά βακτηριακά είδη στη φύση είναι σημαντικά σε συνθήκες περιορισμένης παγοπυρήνωσης.

### 3.1.5. Πρακτικές εφαρμογές των βακτηριακών πυρήνων πάγου.

Βακτηριακοί πυρήνες πάγου μπορούν να υποκινήσουν τον τραυματισμό από παγετό σε πολλά φυτικά είδη. Οι περισσότεροι φυτικοί ιστοί μπορούν να αντέξουν εκτεταμένη υπερψύξη (67-69) ενώ η ζημιά παγετού εμφανίζεται σε θερμοκρασίες που ξεκινούν από τους  $-2^{\circ}\text{C}$ . Πυρήνες πάγου ενεργοί σε θερμοκρασίες πάνω από τους  $-5^{\circ}\text{C}$  είναι σπάνιοι στα αξονικά αναπτυσσόμενα φυτά και ειδικά στα μη ξυλώδη είδη (67-68, Εικόνα 3). Αν και πολλές φυσικές ουσίες, όπως τα μόρια φυτικού ιστού και χόματος, περιέχουν μεγάλους αριθμούς πυρήνων πάγου ενεργούς σε θερμοκρασίες από  $-10^{\circ}\text{C}$  ή και χαμηλότερες, ουσίες που παγοπυρηνώνουν σε θερμοκρασίες ανώτερες από τους  $-5^{\circ}\text{C}$  είναι σπάνιες στη φύση (70-77). Μικρές σταγόνες καθαρού νερού μπορούν να υπερψυχρανθούν περίπου μέχρι τους  $-40^{\circ}\text{C}$  (21). Ακόμη και μεγάλες ποσότητες νερού βρύσης ( $> 10\text{ml}$ ) συνήθως υπερψυχραίνονται περίπου ως τους  $-8^{\circ}\text{C}$ . Τα περισσότερα φυτικά είδη μπορούν να υπερψυχρανθούν περίπου ως τους  $-5^{\circ}\text{C}$ , και τα είδη που είναι ευαίσθητα στον παγετό μπορούν να αποφύγουν βλάβες από σχηματισμό πάγου όταν η θερμοκρασία βρίσκεται πάνω από τους  $-5^{\circ}\text{C}$ , απουσία όμως παγοπυρηνωτικών βακτηριακών ειδών. Όταν τα φυτά αποικίζονται ακόμη και από  $10^3$  παγοπυρηνωτικά βακτηριακά κύτταρα ανά γραμμάριο ιστού, το θερμοκρασιακό κατώφλι για τον σχηματισμό πυρήνων πάγου αυξάνεται πολύ (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Περιεχόμενο πυρήνων πάγου διαφορετικών φυτικών ειδών όταν αυτά αναπτύσσονται αξονικά ή όταν αποικίζονται με 10<sup>3</sup> κύτταρα/gr με τυπικά ενεργά παγοπυρηνωτικά στελέχη είτε του *P. syringae* είτε του *Erwinia herebicola*.

Τα παγοπυρηνωτικά βακτηριακά είδη είναι κοινοί επιφυτικοί κάτοικοι των υγιών φυτών στη φύση (12, 13, 33, 39, 78-82). Τα μεγέθη των πληθυσμών των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων είναι συχνά υψηλότερα των 10<sup>6</sup> κυττάρων ανά γραμμάριο ιστού (12, 13, 33, 39, 78-82). Κατά συνέπεια, οι φυτικοί ιστοί στη φύση περιέχουν μεγάλους αριθμούς βακτηριακών πυρήνων πάγου. Επειδή τα είδη που είναι ευαίσθητα στον παγετό θανατώνονται κατά το σχηματισμό πάγου (31, 83), η μειωμένη δυνατότητα υπερψύξης που προκαλείται από τους επιφυτικούς πληθυσμούς των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων αυξάνει την πιθανότητα ζημιάς λόγω παγετού. Η εφαρμογή βακτηριοκτόνων ή ανταγωνιστικών βακτηρίων για τη μείωση του μεγέθους των πληθυσμών των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων στα φυτικά είδη σε συνθήκες αγρού μπορεί να μειώσει τις επιπτώσεις της ζημιάς παγετού κατά τη διάρκεια φυσικών παγετών με ελάχιστες θερμοκρασίες αέρα ανώτερες ή ίσες των -5°C (33, 78, 84-86). Νέες μέθοδοι για τον έλεγχο παγετού, βασισμένες στον έλεγχο των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων, υπόσχονται έτσι να ελαχιστοποιήσουν τη ζημιά παγετού, που ανέρχεται σε δισεκατομμύρια δολαρίων κατά μέσον όρο χαμένης ετήσιας παραγωγής, σε πολλά ευαίσθητα στον παγετό γεωργικά είδη.

Αν και οι βακτηριακοί πυρήνες πάγου είναι πάντα καταστρεπτικοί στα φυτικά είδη που είναι ευαίσθητα στον παγετό, μπορούν να διαδραματίσουν έναν ρόλο στην ανοχή των σκληραγωγημένων στον παγετό ειδών, του σχηματισμού πάγου. Η υπερψύξη είναι προφανώς καταστρεπτική στα είδη που είναι σκληραγωγημένα στον παγετό και μπορούν να ανεχτούν το σχηματισμό πάγου (31, 87). Τα σκληραγωγημένα είδη μπορούν να ανεχτούν καλύτερα τον πάγο εάν διαμορφωθεί αργά στους ιστούς τους. Μετά από εκτενή υπερψύξη, ο πάγος μπορεί γρήγορα να διαδοθεί σε όλους τους ιστούς, και η μετακίνηση του υγρού νερού στα μεσοκυττάρια διαστήματα δεν λαμβάνει χώρα πλέον με μια μορφή ισορροπίας, οδηγώντας στον ενδοκυτταρικό σχηματισμό πάγου και τον κυτταρικό θάνατο (87). Τα βακτηριακά γονίδια παγοπυρήνωσης εισήχθησαν μέσω μετασχηματισμού με τη βοήθεια του *Agrobacterium tumefaciens* στο ανεκτικό στον παγετό είδος *Solanum commersonii*, και ανιχνεύθηκαν στα διαγενετικά φυτά πυρήνες πάγου ενεργοί από τους  $-3^{\circ}\text{C}$  (88). Η παραγωγή ετερόλογων πυρήνων πάγου υψηλής θερμοκρασίας στα σκληραγωγημένα στον παγετό είδη μπορεί να οδηγήσει σε μια ενισχυμένη ανοχή της ζημιάς παγετού με τον περιορισμό της υπερψύξης του νερού στους ιστούς.

Οι βακτηριακοί πυρήνες πάγου που είναι ενεργοί στις υψηλές, κάτω του σημείου τήξης, θερμοκρασίες μπορούν ενδεχομένως να διαδραματίσουν σημαντικούς πρακτικούς ρόλους στην τεχνητή παραγωγή χιονιού, την τροποποίηση του καιρού, και στην ψύξη ορισμένων τροφίμων. Τα λυοφιλομένα κύτταρα ενός στελέχους του *P. syringae* χρησιμοποιούνται εμπορικά σε μεγάλη κλίμακα ως πρόσθετη ουσία στο νερό που χρησιμοποιείται για την τεχνητή παραγωγή χιονιού (89). Με την αύξηση του μέρους των σταγόνων νερού που παγώνουν ενώ αιωρούνται στον ψυχρό αέρα επάνω από τις πλαγιές σκι, το πληρέστερο πάγωμα αυτών των μορίων μπορεί να λάβει χώρα πριν από την εναπόθεσή τους στο έδαφος. Η πυκνότητα του τεχνητού χιονιού που παράγεται επομένως είναι χαμηλότερη επειδή το πάγωμα είναι πληρέστερο και το ποσό μορίων πάγου που μπορεί να παραχθεί από μια μηχανή παραγωγής χιονιού σε μια δεδομένη χρονική περίοδο αυξάνεται. Είναι κατανοητό ότι τα βακτηριακά κύτταρα θα μπορούσαν επίσης να εισαχθούν στην ατμόσφαιρα για να αρχίσουν το σχηματισμό πάγου σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες στη βάση των νεφών, ενισχύοντας κατά συνέπεια την κατακρήμνιση (90). Αν και θα απαιτούνταν μεγάλοι αριθμοί βακτηριακών κυττάρων ακόμη και για μέτριες τροποποιήσεις της καιρικής δραστηριότητας, και πρέπει να επινοηθούν μέθοδοι για τη διανομή αυτών τα βακτηρίων στους μεγάλους όγκους του αέρα κάτω από τα νέφη, μπορούν ακόμα να

διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της κατακρήμνισης ή να μετριάσουν επικίνδυνα μετεωρολογικά φαινόμενα όπως το χαλάζι. Η προσθήκη των βακτηριακών πυρήνων πάγου στα τρόφιμα μπορεί να αλλάξει το μοτίβο της κρυστάλλωσης του πάγου, οδηγώντας σε ένα πιο επιθυμητό παγωμένο προϊόν (91). Σε όλες αυτές τις εφαρμογές, η παγοπυρήνωση του νερού στις υψηλότερες πιθανές, κάτω του σημείου τήξης, θερμοκρασίες αυξάνει τη χρησιμότητα των βακτηριακών πυρήνων πάγου.

Τα κύτταρα των ενεργών παγοπυρηνωτικών βακτηρίων, *P. syringae* και *E. herbicola*, καλλιεργήθηκαν στους 18°C με τα θρεπτικά μέσα nutrient broth ή/και yeast extract και συγκομίστηκαν στη λογαριθμική φάση για τη μέγιστη παγοπυρηνωτική δραστηριότητα. Ενσωματώθηκαν σε πρότυπα συστήματα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της ζάχαρης, πρωτεϊνικών διαλυμάτων και αιωρημάτων ελαίου/ νερού, που αντιπροσωπεύουν τα σημαντικότερα συστατικά των τροφίμων, για να ερευνηθούν τα αποτελέσματά τους στην ψύξη. Οι θερμοκρασίες παγοπυρήνωσης όλων των επεξεργασμένων προτύπων αυξήθηκαν σημαντικά κατά 3.0 με 5.9°C σε σχέση με τους μάρτυρες όπου η θερμοκρασία των ψυκτήρων είχε τεθεί στους -6 με -7°C. Η εφαρμογή των παγοπυρηνωτικών κυττάρων προκάλεσε επίσης την ψύξη ορισμένων πρότυπων διαλυμάτων στους -6°C, όπως το διάλυμα σακχαρόζης (10%), το οποίο δεν πάγωσε στις ίδιες συνθήκες απουσία των βακτηριακών παγοπυρηνωτικών κυττάρων. Η προσθήκη των παγοπυρηνωτικών κυττάρων ελάττωσε επίσης το συνολικό χρόνο ψύξης των πρότυπων συστημάτων μεταξύ 20 και 38%. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι με την εφαρμογή της βακτηριακής παγοπυρήνωσης, μερικές τρέχουσες διαδικασίες ψύξης των τροφίμων μπορούν να τροποποιηθούν και να λειτουργήσουν σε θερμοκρασίες υψηλότερες του μηδενός και να συνεχίσουν να παρέχουν εγγυημένη ψύξη, αποταμίευση ενέργειας και βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της ποιότητας των προϊόντων.

Ο χειμερινός αθλητισμός είναι μεγάλη επιχείρηση, αλλά οι φυσικές χιονοπτώσεις από τις οποίες εξαρτάται είναι απρόβλεπτες στις περισσότερες τοποθεσίες και έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες, η τεχνολογία παραγωγής χιονιού έχει γίνει τυπικός εξοπλισμός στα περισσότερα χιονοδρομικά κέντρα σε όλο τον κόσμο. Τα τελευταία χρόνια, ένας αυξανόμενος αριθμός θερέτρων χρησιμοποιεί μια πρωτεΐνη ως πυρηνωτικό παράγοντα (που ονομάζεται "Snowmax" στο εμπόριο) προερχόμενη από βακτήρια *Pseudomonas syringae*. Αυτή η πρωτεΐνη προστίθεται στο νερό και κάνει τα σταγονίδια να κρυσταλλώσουν ευκολότερα, παράγοντας κατά συνέπεια περισσότερο

χιόνι για ένα δεδομένο ποσό νερού. Αυτό μπορεί να μειώσει την ανάγκη τόσο σε ισχύ όσο και σε ενέργεια.

Είναι πολύ σημαντικό να παρουσιαστούν νέοι φυσικοί παγοπυρηνωτές. Βιολογικοί παγοπυρηνωτές χρησιμοποιούνται κατ'επανάληψη ως πρόσθετες ουσίες παραγωγής χιονιού σε περιοχές σκι σε όλη τη Βόρεια Αμερική, Νότια Αμερική, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία. Οι LaDuca et al. (145), εξηγούν ότι οι περισσότεροι φυσικοί πυρήνες πάγου στην ατμόσφαιρα δεν είναι ενεργοί σε θερμοκρασίες υψηλότερες των  $-10^{\circ}\text{C}$ . Για αυτόν τον λόγο υπάρχει ένα συνεχές ενδιαφέρον για την έρευνα για νέους πυρήνες πάγου που μπορούν να μετατρέψουν το υγρό νερό σε κρυστάλλους πάγου στο χαμηλότερο δυνατό βαθμό υπέρψυξης. Βρέθηκαν πολυάριθμα βακτηριακά γένη που παγοπυρηνώνουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες και θα μπορούσαν να παρουσιαστούν εμπορικά ως βιολογικά ενεργά παγοπυρηνωτικά προϊόντα.

Η εφαρμογή του *P. syringae* ως παγοπυρηνωτή για την κατασκευή του τεχνητού χιονιού έχει δημιουργήσει ερωτήματα σχετικά με την απελευθέρωση των μικροοργανισμών στα αλπικά περιβάλλοντα (146). Το κύτταρο του *P. syringae*, το οποίο είναι εγκαθυλωμένο στους κρύσταλλους του τεχνητού χιονιού, μπορεί να έρθει σε επαφή με το χώμα και τα φυσικά νερά από την απορροή του λιωμένου χιονιού. Οι κύκλοι ψύξης - θέρμανσης, το φως του ήλιου και η επαφή με το έδαφος εντούτοις, περιορίζουν σοβαρά την επιβίωση αυτού του μικροοργανισμού (146). Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι το *P. syringae* σπάνια είναι παρόν σε εδαφολογικά δείγματα. Οι LaDuca et al. (145), διαπίστωσαν επίσης ότι τα φυσικά στελέχη του *P. syringae* είναι ευαίσθητα στη λυτική μόλυνση από βακτηριοφάγους. Εξήγησαν περαιτέρω ότι η κυτταρική λύση λόγω της μόλυνσης από φάγο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης είναι καταστρεπτική για την παραγωγή παγοπυρηνωτικής δραστηριότητας και το *P. syringae* πρέπει να προφυλαχθεί στο περιβάλλον παραγωγής. Το λυτικό φαινόμενο σε μεγάλης κλίμακας κατασκευή οποιουδήποτε μικροβιακού προϊόντος συμπεριλαμβανομένων των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων μπορεί να αντιμετωπιστεί με την απομόνωση βακτηριακών ειδών που έχουν ανοσία στη λυτική μόλυνση. Κατά αυτόν τον τρόπο είναι απαραίτητο να βρεθεί μια οικογένεια ανθεκτικών παγοπυρηνωτικών παραγωγών στους βακτηριοφάγους, οι οποίοι θα είναι σε θέση να ελαχιστοποιήσουν την ευαισθησία της εμπορικής διαδικασίας στις αποτυχίες ζύμωσης λόγω λύσης.

### 3.2. ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΠΑΓΟΠΥΡΗΝΩΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΚΛΙΜΑΤΟΣ.

Περίπου 20 χρόνια πριν, μερικοί μικροβιολόγοι και φυσικοί ατμόσφαιρας πρότειναν ανεξάρτητα ότι ορισμένοι τύποι βακτηρίων που σχετίζονται με φυτά, βρίσκονται εύκολα στην ατμόσφαιρα και θα μπορούσαν να είναι σημαντικοί καταλύτες των βροχοπτώσεων. Οι φυσικοί κατέληξαν σε αυτό το συμπέρασμα επειδή αυτά τα βακτήρια παράγουν μια πρωτεΐνη στην εξωτερική τους μεμβράνη που είναι ένας από τους πιο ενεργούς φυσικούς πυρήνες πάγου (ενώσεις ικανές να καταλύσουν την ψύξη του νερού), και επειδή η τήξη του νερού των νεφών είναι ένα κρίσιμο βήμα για τις βροχοπτώσεις πάνω από μεγάλα τμήματα της γης. Οι μικροβιολόγοι κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα και πρότειναν ότι αυτά τα βακτήρια που απαντώνται ευρέως στα φυτά σε όλο τον πλανήτη και πολλαπλασιάζονται εύκολα, επιζούν της αερομεταφερόμενης διάδοσης μέσω των νεφών και επιστρέφουν στη γη με την κατακρήμνιση (149). Εάν αυτά τα βακτήρια διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στην κατακρήμνιση και οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτό συμβαίνει μπορούν να ποσοτικοποιηθούν, τότε οι δυνάμεις από τις οποίες παράγονται στην ατμόσφαιρα θα μπορούσαν μια ημέρα να χρησιμοποιηθούν σε μία προσπάθεια να αλλάξουν τις διαδικασίες σχηματισμού νεφών προς εφαρμογές όπως ο μετριασμός της ξηρασίας. Η κατανόηση αυτών των διαδικασιών θα μπορούσε επίσης να δώσει ενδείξεις για το ρόλο άλλων βιολογικών πυρήνων πάγου, όπως η γύρη, στις ατμοσφαιρικές διαδικασίες. Παρά την σημασία της, η έρευνα πάνω σε αυτά τα ερωτήματα δεν προχώρησε για μερικές δεκαετίες.

Η διεπιστημονική προσέγγιση που απαιτείται για την εξέταση αυτής της ερώτησης εξηγείται με μια επισκόπηση των διαδικασιών που εμπλέκονται σε αυτήν την αλληλεπίδραση των βακτηρίων με την ατμόσφαιρα: τα ενεργά παγοπυρηνωτικά βακτήρια (όπως τα *P. syringae*) διαμένουν φυσιολογικά στις εναέριες επιφάνειες πολλών φυτικών τύπων. Ο φυτικός τύπος (είδος, ποικιλία) επηρεάζει την αφθονία αυτών των βακτηρίων στις επιφάνειές τους. Μερικά φυτά είναι ευαίσθητα σε αυτό το βακτήριο ως παθογόνο αλλά σπάνια θανατώνονται άμεσα από αυτόν τον οργανισμό. Ο βαθμός στον οποίο οι διαφορετικοί φυτικοί τύποι καταλαμβάνουν την επιφάνεια του εδάφους καθορίζεται από τις γεωργικές πρακτικές και τις διοικητικές πολιτικές

εδάφους των οποίων οι στόχοι, συχνά, συνδέονται στενά με σχετικά βραχυπρόθεσμα οικονομικά θέματα. Η απομάκρυνση των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων από τα φυτά επηρεάζεται από το φυσικό περιβάλλον με τρόπους που δεν έχουν ακόμα διευκρινισθεί οδηγώντας στη δημιουργία σωματιδίων με άγνωστες αεροδυναμικές ιδιότητες. Όπως για κάθε αερομεταφερόμενο σωματίδιο, η φυσική της απογείωσης και το συνακόλουθο μολυσμένο σωματίδιο επηρεάζουν την τροχιά των βακτηρίων προς την ατμόσφαιρα. Η τροχιά τους εξαρτάται επίσης από τις μετακινήσεις του αέρα σε μικρο- και μακροκλίμακα που συνδέονται με τη χρήση της γης και την τοπογραφία (13, 70, 150, 151). Ο πιθανός καταλυτικός αντίκτυπος αυτών των βακτηρίων στην ψήξη του νερού των νεφών εξαρτάται από τη συνολική μικροφυσική του νέφους και από την πιθανή αδρανοποίηση (ή αύξηση) της παγοπυρηνωτικής ικανότητας από την παρουσία χημικών ουσιών στο νερό των νεφών. Επιπλέον, για να είναι ενεργά ως πυρήνες πάγου αυτά τα βακτήρια πρέπει να βιώσουν τις συνθήκες που θα οδηγήσουν στην παραγωγή της παγοπυρηνωτικής πρωτεΐνης τους και πρέπει να είναι ζωντανά ή τουλάχιστον ακέραια για να διατηρήσουν τη δραστηριότητά της. Στην ατμόσφαιρα, τα βακτήρια μπορούν να πεθάνουν ή ακόμη και να πολλαπλασιαστούν (152). Η παραγωγή της παγοπυρηνωτικής πρωτεΐνης και η επιβίωση στον αέρα μπορεί να εξαρτηθεί από τη φυσιολογική κατάσταση που επιτυγχάνουν τα βακτήρια κατά την ανάπτυξή τους στα φυτά.

Απαιτείται η συμβολή τουλάχιστον τεσσάρων από τους παρακάτω μείζονες επιστημονικούς τομείς για να ερευνηθεί ο ρόλος των ενεργών παγοπυρηνωτικών βακτηρίων στα νέφη και την κατακρήμνιση: Η Μικροβιολογία, η Φυτοπαθολογία, η Φυσική, η Αγρονομία, η Μηχανική, η Μετεωρολογία και η Ατμοσφαιρολογία. Μεταξύ των λίγων επιστημόνων που εξετάζουν το ρόλο των βιολογικών αερολυμάτων και των πρακτικών χρήσης του εδάφους στις ατμοσφαιρικές διαδικασίες, οι περισσότεροι εργάζονται σε ευρωπαϊκά ιδρύματα.

Ενώ η ιδέα ότι τα βακτήρια θα μπορούσαν να υποκινήσουν την κατακρήμνιση ήταν γνωστή, πρόσφατα πειραματικά αποτελέσματα που δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό Science δείχνουν ότι ο ρόλος τους είναι σημαντικότερος απ'ό,τι πιστευόταν (20). Ερευνητές καθοδηγούμενοι από τον μικροβιολόγο Brent Christner του κρατικού πανεπιστημίου της Λουιζιάνας ανέλυσαν δείγματα χιονιού από όλο τον κόσμο, αναζητώντας και χαρακτηρίζοντας βιολογικής προέλευσης πυρήνες συμπύκνωσης και πάγου. Το χιόνι και η βροχή στις περισσότερες περιπτώσεις αρχίζουν ως πάγος. Αν και το νερό θεωρείται ότι έχει σημείο ψύξης τους 0°C, δεν είναι τόσο απλό στα νέφη,

όπου μόνο υδρατμοί σχηματίζουν κρυστάλλους πάγου σε υπερβολικά χαμηλές θερμοκρασίες. Οι πυρήνες πάγου επιτρέπουν να λάβει χώρα η κρυστάλλωση σε θερμοκρασίες πιο κοντά στους 0°C. Οι Christner et al. βρήκαν πυρήνες πάγου βιολογικής προέλευσης σχεδόν σε κάθε δείγμα. "Οι Ατμοσφαιρολόγοι δεν είχαν αναγνωρίσει προηγουμένως ότι αυτά τα μόρια είναι τόσο ευρέως διαδεδομένα", ανέφερε. Αυτές οι διαπιστώσεις δημιουργούν το ερώτημα για το πώς η αλλαγή του κλίματος και οι ανθρώπινες δραστηριότητες θα μπορούσαν να επηρεάσουν τους αριθμούς των βακτηρίων στην ατμόσφαιρα. Πιο άμεσα, είναι ένα σημείο εκκίνησης της έρευνας για τη συνεισφορά των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων στο σχηματισμό νεφών και την κατακρήμνιση. Στην πιο πρόσφατη έκθεσή της, η Διακυβερνητική επιτροπή για την αλλαγή του κλίματος (IPPC) σχολιάζει ότι ο αντίκτυπος των βρόχων ανατροφοδότησης που σχετίζονται με τα νέφη στα παγκόσμια καιρικά μοντέλα είναι η μεγαλύτερη πηγή αβεβαιότητας στις τρέχουσες προβλέψεις για την αλλαγή του κλίματος. Τα συμπεράσματα των Christner et al. δεν ανατρέπουν τα θεμελιώδη συμπεράσματα του IPCC - μια υψηλή πιθανότητα εντυπωσιακά αυξανόμενων παγκόσμιων θερμοκρασιών της τάξης των 6°C μέσα στα επόμενα εκατό χρόνια - αλλά πρέπει να κεντρίσουν την έρευνα που θα βοηθήσει τους επιστήμονες να προβλέψουν τις αλλαγές με περισσότερες λεπτομέρειες, είτε ο κλιματολόγος Leo Donner του Πανεπιστημίου του Princeton, ο οποίος δεν είχε συμμετάσχει στη μελέτη. Ο Donner συμφώνησε ότι οι κλιματολόγοι δεν είχαν εκτιμήσει την απανταχού παρουσία των βακτηρίων που προκαλούν υετό στην ατμόσφαιρα, κάτι που υποστηρίζει χωρίς ακόμα να αποδειχθεί επαρκώς. Είπε: "Μια από τις πραγματικές αβεβαιότητες στο κλιματικό σύστημα είναι ο τρόπος πυρήνωσης των μορίων των νεφών." Τα κλιματικά πρότυπα χρειάζονται πληροφορίες για τους πυρηνωτές. Αυτό είναι αναγκαίο για την κατανόηση των αλλαγών που παρατηρούνται στα νέφη σε αντιστοιχία με τις αλλαγές της ατμοσφαιρικής σύνθεσης." Το γεγονός ότι τα βακτήρια μπορούν να εμπλέκονται στο σχηματισμό χιονιού και βροχής διατυπώθηκε στη δεκαετία του '70 από τον David Sands, ένα φυτοπαθολόγο του κρατικού πανεπιστημίου της Μοντάνα των ΗΠΑ, κατά τη διάρκεια της έρευνάς του για το *P. syringae*, ένα βακτήριο που προάγει τον πάγο στα φύλλα. Ανίκανος να ανακαλύψει την πηγή επανειλημμένα μολυσμένων αγρών, ο Sands εξοργισμένος έψαξε την πηγή του προβλήματος στους ουρανούς. Έτσι πέταξε με αεροπλάνο, άνοιξε ένα παράθυρο και κράτησε ένα δίσκο petri έξω και πράγματι, αναπτύχθηκαν βακτήρια. Τα βακτήρια - που κανονικά ζουν στα φυτά - έπεφταν από τον ουρανό. Τα βρήκε σε κάθε δείγμα



που εξέτασε. Βρήκε αυτά τα βακτήρια παντού - στη Γαλλία, στη Μοντάνα, στο Γιούκον. Και σε μερικά αρκετά απίθανα μέρη όπως η Ανταρκτική όπου εκεί δεν υπάρχουν φυτά. Σύμφωνα με τον Steven Lindow, του Πανεπιστημίου Μπέρκλεϋ της Καλιφόρνιας, αυτά τα βακτήρια χρησιμοποιούν την ατμόσφαιρα σαν έναν εναέριο αυτοκινητόδρομο. "Μπορούν να αφήσουν τα φυτά, να φθάσουν στην ανώτερη ατμόσφαιρα, (και) να προσαρτηθούν στα ατμοσφαιρικά μόρια που θα πέσουν αργότερα ως βροχή ή χιόνι," λέει ο Lindow. "Αυτό θα τα έφερνε πίσω στη γη ακόμη και ως σταγόνες βροχής επάνω σε νέα φυτά όπου μπορούν να βρουν νέα εστία και να αρχίσουν τον κύκλο από την αρχή"(149).

Το *P. syringae* δεν είναι ο μόνος, αλλά ο πιο κοινός βιολογικός παγοπυρηνωτής και όλες οι ποικιλίες μοιράζονται μια πρωτεϊνική δομή που παρέχει ένα ικρίωμα για τα ελεύθερα μόρια νερού. Αφού πρώτα συνδεθούν στα βακτήρια και μεταξύ τους, οι υδρατμοί είναι σε θέση να παγώσουν, και να πέσουν τελικά πίσω στη γη. Σε μία καθαρή κατάσταση, οι υδρατμοί παγώνουν σε θερμοκρασίες κάτω από τους  $-35^{\circ}\text{C}$ . Οι πυρηνωτές επιτρέπουν αυτό να συμβεί σε θερμότερες συνθήκες, και η μελέτη του Christner διαπίστωσε ότι τα βακτήρια είναι οι πιο κοινοί πυρηνωτές υψηλής θερμοκρασίας. Οι ερευνητές ποτέ δεν συνειδητοποίησαν ότι τα βακτήρια θα μπορούσαν να είναι τόσο διαδεδομένα στα νέφη, είπε ο Christner, επειδή οι τεχνολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για να μετρήσουν τη λεπτή σκόνη - παραδοσιακά θεωρείται ο σημαντικότερος παγοπυρηνωτής - αγνοούν τα μόρια μεγέθους μικροβίου. Ο ατμοσφαιρολόγος Russell Schnell της εθνικής ωκεάνειας και ατμοσφαιρικής διοίκησης παρατήρησε το 1985 ότι " η έρευνα έχει δείξει ότι η καθαρή σκόνη, χωρίς βιολογικά υλικά από φυτά ή βακτήρια, ήταν άχρηστη." Θεωρούσε ότι η υπερβόσκηση και η αποδάσωση προκάλεσαν την ξηρασία στην Αφρική με τη μείωση των αερομεταφερόμενων βακτηρίων. Η πρόσφατη έρευνα συμπεριλαμβάνοντας την ανακάλυψη βακτηρίων στην Ανταρκτική δείχνει ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στις χιονοπτώσεις στους πόλους. Αυτή η έρευνα θα μπορούσε να αλλάξει τις θεωρίες για το σχηματισμό νεφών. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν το σχηματισμό πάγου σε θερμοκρασίες υψηλότερες από αυτές που θα εμφανιζόταν μόνο με τα μόρια σκόνης. Εάν τα φυτικά βακτήρια διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στο σχηματισμό κρυστάλλων πάγου και συνεπώς το σχηματισμό νεφών, τότε η ανάπτυξη των φυτών τείνει να μειώσει την ηλιακή θέρμανση προκαλώντας το σχηματισμό των νεφών που ανακλούν την ηλιακή ακτινοβολία πίσω στο διάστημα. Το διοξείδιο του άνθρακα ενθαρρύνει την φυτική ανάπτυξη που θα σήμαινε ότι το διοξείδιο του άνθρακα

μειώνει την ηλιακή θέρμανση που θα οδηγούσε στη μείωση και όχι στην αύξηση της θερμοκρασίας παγκόσμια λόγω του φαινομένου του θερμοκηπίου.

Ο πιθανός ρόλος των βακτηρίων που σχετίζονται με φυτά σε μια σημαντική κλιματολογική διαδικασία όπως η βροχόπτωση προτάθηκε πάνω από 20 χρόνια πριν. Εν τούτοις, λόγω των ορίων στους τομείς της μικροφυσικής της ατμόσφαιρας και των επίμονων διχασμών στην έρευνα στη φυσική και στη βιολογία, αυτή η ιδέα δεν έχει εξερευνηθεί. Πολυάριθμοι σύγχρονοι παράγοντες τη φέρνουν στην πρώτη γραμμή σήμερα. Αυτοί περιλαμβάνουν τις επεκτεινόμενες και επαναλαμβανόμενες ξηρασίες, την αυξανόμενη ανησυχία για τις ενδεχομένως αθεράπευτες αλλαγές στο κλίμα του πλανήτη μας και τη διαθεσιμότητα όλο και περισσότερων εκλεπτυσμένων αναλυτικών εργαλείων για την κατανόηση της μικροφυσικής των ατμοσφαιρικών διαδικασιών. Το ανανεωμένο ενδιαφέρον για αυτό το θέμα συνοδεύεται από τα προφανή ερωτήματα του πώς τα βιολογικά αερολύματα αλληλεπιδρούν γενικά με την ατμόσφαιρα και εάν η ατμόσφαιρα είναι, στην πραγματικότητα, ένας μικροβιολογικός βιότοπος.

Πώς είναι δυνατό τα βιολογικά αερολύματα να μπορούν να επηρεάσουν τις διαδικασίες κατακρήμνισης; Η πρώτη γραμμή συλλογισμού αφορά ποιες φυσικές διαδικασίες θεωρούνται κρίσιμες για το σχηματισμό βροχής. Από τη δεκαετία του '30, μια σημαντική αρχή της μικροφυσικής των νεφών είναι ότι απαιτείται η παρουσία της φάσης πάγου για την κατακρήμνιση από τα υπέρψυχρα νέφη, τουλάχιστον έξω από τους τροπικούς κύκλους. Η τήξη του νερού απαιτεί καταλύτες γνωστούς ως πυρήνες πάγου. Ελλείψει των καταλυτών για την τήξη, το νερό μπορεί να παραμείνει σε μια σχεδόν ασταθή υγρή κατάσταση σε θερμοκρασίες αρκετά κάτω από τους 0°C. Το νερό σε υγρή κατάσταση στις θερμοκρασίες κάτω από τους 0°C αναφέρεται ως υπέρψυχρο νερό. Η αυθόρμητη τήξη του υπέρψυχρου νερού εμφανίζεται κατωτέρω των -39°C. Ως εκ τούτου, οι πυρήνες πάγου είναι σαφώς ουσιαστικοί για τις φυσικές διαδικασίες τήξης έξω από τις πολικές περιοχές, τις ακραίες χειμερινές εποχές στη γη και ένα μεγάλο μέρος της αντίστοιχης τροπόσφαιρας. Στα χαμηλότερα νέφη της τροπόσφαιρας όπου οι θερμοκρασίες είναι κάτω από το μηδέν αλλά υψηλότερες των -40°C, οι πυρήνες πάγου έχουν σημαντικό ρόλο σε αυτόν τον σχηματισμό πάγου. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα στους στρωματοσφωρείτες και τους μικρούς σφωρείτες, νέφη όπου οι θερμοκρασίες στην κορυφή τους είναι συχνά υψηλότερες των -5°C και που δεν υπάρχει καμία δευτεροβάθμια διαδικασία σχηματισμού πάγου (όπως η διάρρηξη των κρυστάλλων πάγου και του σχηματισμού θραυσμάτων πάγου όταν συγκρούονται

μεγαλύτερα σταγονίδια με τους κρυστάλλους πάγου στα νέφη). Ως εκ τούτου, μερικές από τις κύριες στρατηγικές για την τροποποίηση του καιρού, όπως η σπορά των νεφών με πυρήνες πάγου, είναι βασισμένες στην υπόθεση ότι ο σχηματισμός νέων μορίων πάγου, γύρω από τους γόνους, μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της κατακρήμνισης υπό ορισμένες συνθήκες. Ενώ η επιτυχία τέτοιων στρατηγικών παραμένει υπό επιστημονική διερεύνηση, η επίδραση των φυσικών και τεχνητών πυρήνων πάγου στην παραγωγή πάγου στα νέφη είναι αδιαφιλονίκητη.

Η δεύτερη θέση του συλλογισμού αφορά στο γεγονός ότι μερικά από τα βιολογικά μόρια στα ατμοσφαιρικά αερολύματα μπορούν να καταλύσουν την τήξη του υπέρψυχρου νερού. Αυτά τα μόρια αναφέρονται ως ενεργά παγοπυρηνωτικά. Ένα ευρύ φάσμα φυσικών και συνθετικών, οργανικών και ανόργανων ουσιών είναι παγοπυρηνωτικά. Αυτά περιλαμβάνουν την αιθάλη, την ορυκτή σκόνη, τα μεταλλικά μόρια και τα σύμπλοκα τερπενίου - ιωδίου. Ο ιωδιούχος άργυρος, που έχει χρησιμοποιηθεί στις προσπάθειες να αυξηθούν οι βροχοπτώσεις ή να μειωθεί το χαλάζι τα νέφη, είναι η πιο γνωστή από αυτές τις ουσίες. Διάφοροι οργανισμοί συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των μυκήτων, των βακτηρίων, των σπονδυλωτών και των ασπόνδυλων παράγουν επίσης παγοπυρηνωτικές πρωτεΐνες. Οι καλύτερα περιγραφόμενοι βιολογικοί παγοπυρηνωτές είναι κοινά βακτήρια που έχουν όμως σχέση με τα φυτά. Η παγοπυρηνωτική δραστηριότητα αυτών των βακτηρίων οφείλεται σε μια πρωτεΐνη που είναι αγκυροβολημένη στο εξωτερικό μέρος της κυτταρικής μεμβράνης τους και εκτεθειμένη στο εξωτερικό περιβάλλον. Η βακτηριακή παγοπυρηνωτική πρωτεΐνη μπορεί να προκαλέσει την τήξη του υπέρψυχρου νερού σε θερμοκρασίες τόσο υψηλές όσο τους  $-2^{\circ}\text{C}$ . Αυτά τα βακτήρια εκπέμπονται από τις φυτικές κόμεις με καθαρά ανοδικά ποσοστά των 1000 έως  $10^5$  βακτήρια/ $\text{m}^2/\text{hr}$  και έχουν επίσης ανιχνευθεί στα νέφη σε διάφορα ύψη από την επιφάνεια της γης, μετρημένα μερικές φορές σε χιλιόμετρα. Λόγω της αφθονίας αυτών των βακτηρίων στη γη και της παρουσίας τους στην ατμόσφαιρα, και λόγω των σχετικά υψηλών θερμοκρασιών στις οποίες μπορούν να προκαλέσουν τήξη, μερικοί φυσικοί νεφών έχουν προτείνει ότι θα μπορούσαν να είναι οι σημαντικότεροι φυσικοί πυρήνες πάγου στην ατμόσφαιρα. Άλλοι ατμοσφαιρικοί βιολογικοί πυρήνες πάγου περιλαμβάνουν τη γύρη από ορισμένες χλόες και δέντρα.

Ο αντίκτυπος των μορίων αερολύματος, γενικά, στα νέφη και το κλίμα είναι μια φτωχά ποσοτικοποιημένη διαδικασία. Για να καταλάβουμε πώς συμβάλλουν τα βιολογικά υλικά στην επίδραση του κλίματος, με τρόπο παρόμοιο που οι ορυκτές

σκόνες θεωρούνται πιθανοί παράγοντες επιρροής, θα απαιτηθεί η γνώση της πηγής και των λειτουργιών διασποράς, της εξάρτησης στις μετεωρολογικές συνθήκες, των διαφορών μεταξύ των τύπων βακτηρίων που παράγονται σε διαφορετικές περιοχές, και η εφαρμογή αυτής της γνώσης σε τοπικά και παγκόσμια πρότυπα κλίματος που βελτιώνονται προς το παρόν, στην απορρόφηση τέτοιων λεπτομερειών και την πρόβλεψη των αντικτύπων στα νέφη και την κατακρήμνιση. Ένα μεγάλο μέρος της προκαταρκτικής εργασίας που γίνεται για άλλους τύπους αερολύματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή των επιδράσεων των βιολογικών αερολυμάτων. Επιπλέον, ο αντίκτυπος των βιολογικών μορίων στα νέφη επεκτείνεται πέρα από την ενδεχόμενη επίπτωση στην κατακρήμνιση. Οι επιδράσεις στη φάση των νεφών και στην κατακρήμνιση τροφοδοτούν το παγκόσμιο κύκλο ενέργειας και νερού. Αυτό και μόνο είναι κίνητρο για την κατανόηση του ρόλου των βιολογικών αερολυμάτων.

Όπως αναφέρεται ανωτέρω, τα φυτά είναι η κύρια πηγή αυτών των ατμοσφαιρικών βιολογικών αερολυμάτων και πυρήνων πάγου. Ως εκ τούτου, ο αντίκτυπός τους στις ατμοσφαιρικές διαδικασίες συνδέεται στενά με την γεωργία και τις άλλες χρήσεις γης. Αυτή η σύνδεση επανεπισχύεται περαιτέρω από άλλες παρατηρηθείσες σχέσεις μεταξύ της τοπογραφίας και του κλίματος. Συγκεκριμένα, οι ιδιότητες της επιφάνειας του εδάφους φαίνεται ότι είναι μια κινητήρια δύναμη της ατμοσφαιρικής μεταβλητότητας (153). Υπάρχουν στοιχεία ότι η σύνθεση της βλάστησης και η ένταση της άρδευσης μπορούν να έχουν σημαντική επιρροή στις βροχοπτώσεις (153). Έχει προταθεί ότι η απογύμνωση της δυτικής Αφρικής και η αποδάσωση σε κάποια από τα Κανάρια νησιά έχουν συνθέσει διαδικασίες που οδηγούν στη μειωμένη κατακρήμνιση, ενώ η άρδευση και η επέκταση των καλλιεργούμενων περιοχών μπορούν να οδηγήσουν σε ενισχυμένες βροχοπτώσεις (153-156). Η βλάστηση αλλάζει πολυάριθμες ιδιότητες της επιφάνειας του εδάφους που συνδέονται με το σχηματισμό της βροχής. Οι ιδιότητες που θεωρούνται από τους μετεωρολόγους σημαντικές για το σχηματισμό νετού, περιλαμβάνουν γενικά τη διαθεσιμότητα: 1) νερού που μπορεί να μεταφερθεί ως ατμός στον αέρα και 2) της ενέργειας που είναι απαραίτητη για την εξάτμιση. Η αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών ιδιοτήτων, όπως η ανάκλαση του φωτός από την επιφάνεια της γης, η εκπομπή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, ο στροβιλισμός και η συγκράτηση της υγρασίας, με τα ποσοστά εκπομπής πυρήνων πάγου από τα φυτά δεν έχει ερευνηθεί.

Ο όγκος των πληροφοριών για τους βιολογικούς πυρήνες πάγου, τη μετεωρολογία και την ατμοσφαιρική μικροφυσική δίνει ενδείξεις ότι η σύνθεση της βλάστησης και οι

γεωργικές πρακτικές γενικά, έχουν συνέπειες στις διαδικασίες σχηματισμού νεφών και σχηματισμού υετού. Έτσι, αυτό μας οδηγεί στην ερώτηση: Πώς έχουν επηρεάσει η καλλιέργεια, η εξόντωση και η αναπαραγωγή των φυτών το σχηματισμό υετού; Πόση ερήμωση προκαλείται από τον άνθρωπο μέσω της βοσκής των ζώων πέρα από ένα υποφερτό επίπεδο; Η προτίμηση των παραγωγών για συγκεκριμένες καλλιέργειες και η επιλογή και η αναπαραγωγή των ποικιλιών τους θα ήταν διαφορετική εάν είχαμε λάβει υπόψη τον αριθμό των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων στις φυτικές ποικιλίες; Αυτές οι ερωτήσεις θα μπορούσαν να τεθούν σε εκείνους που είναι σχετικοί με τις πολιτικές χρήσης του εδάφους γενικά. (7)

### 3.2.1. *Επιστημονικό υπόβαθρο και αιτιολόγηση.*

Έξω από τις αστικές ζώνες, ο αέρας πάνω από τις ηπείρους περιέχει  $3 \times 10^8$  έως  $5 \times 10^9$  μόρια/ $m^3$ . Οι ανόργανες σκόνες είναι άφθονες στα ατμοσφαιρικά αερολύματα και στις μολυσμένες περιοχές ένα σημαντικό συστατικό αυτών των αερολυμάτων μπορεί να είναι αιθάλη, θεικό άλας και οργανικές ενώσεις. Αλλά, μέχρι και 25% ή περισσότερο των αερολυμάτων μπορεί να είναι βιολογικής προέλευσης, ανάλογα με το ύψος. Η φαινομενικά αβιοτική ατμόσφαιρα που περιβάλλει τον πλανήτη μας είναι ένα μείγμα βιολογικών μορίων συμπεριλαμβανομένων: βακτηρίων, πρωτοζώων, σπορίων μυκήτων, φτερών και βρύων, μορίων ιών, μερών εντόμων και ακαριών, σκόνης και κόκκων άλγης και γύρης. Σε μερικές περιπτώσεις, αυτά τα βιοτικά μόρια που λαμβάνονται από τον αέρα, είναι νεκρά θραύσματα. Αλλά συχνά, η εναέρια διασπορά είναι ένα αναπόσπαστο τμήμα του κύκλου ζωής των οργανισμών, ένα είδος λεωφόρου με ευκαιρίες για την ετερομιξία των ειδών, συμπληρωματικών πηγών τροφής και υδάτινων πόρων. Σε ύψη κάτω των 15 m, υπάρχουν από εκατοντάδες έως χιλιάδες μόρια βιολογικής προέλευσης ανά  $m^3$  αέρα. Πάνω από μια προαστιακή περιοχή ο πληθυσμός των μικροοργανισμών, παραδείγματος χάριν, στον αέρα έχει παρατηρηθεί ότι είναι τόσο υψηλός που αγγίζει τις 7000 καλλιεργήσιμου πολλαπλασιαστικού υλικού μυκήτων και 1600 καλλιεργήσιμων βακτηρίων/ $m^3$ . Το μεγαλύτερο μέρος του λαϊκού ενδιαφέροντος για την αεροβιολογία αφορά την παρουσία - στον αέρα που αναπνέουμε - βιολογικών μορίων με άμεσες αρνητικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία όπως τα αλλεργιογόνα, παράγοντες που προκαλούν πνευμονία και άλλων πνευμονικών ασθενειών και της σηψαιμίας στο περιβάλλον των

νοσοκομείων. Αυτή η ανθρωποκεντρική οπτική σκοπιά της προέλευσης και του αντίκτυπου των βιολογικών μορίων στον αέρα είναι μόνο μια πτυχή της αεροβιολογίας. Για τα βακτήρια, παραδείγματος χάριν, τα αερομεταφερόμενα κύτταρα προέρχονται κυρίως από τα φυτά και το χώμα. Έχουν ανιχνευθεί χιλιάδες βακτήρια/m<sup>3</sup> στον αέρα επάνω από δάση και αγρούς καλλιεργημένους με σίτο.

Οι γεωργικές δραστηριότητες, όπως το φρεζάρισμα, μπορούν να εκτοξεύσουν αυτήν την τιμή έως και τα 10<sup>9</sup> βακτήρια/m<sup>3</sup>. Η ροή των βακτηρίων που εκπέμπονται από τις κόμεις των φυτών έχει επίσης μετρηθεί. Για το φασόλι, την αλφάλα και το σίτο, εκπέμπονται βακτήρια σε ένα καθαρό ανοδικό ρυθμό 50 έως 500 καλλιεργήσιμων κυττάρων/m<sup>3</sup>/sec. Οι γεωργικές δραστηριότητες μπορούν να αυξήσουν εντυπωσιακά αυτές τις τιμές.

Στην ατμόσφαιρα, αυτά τα βιολογικά μόρια είναι σε επαφή με υδρατμούς, σταγονίδια νερού και χημικές ουσίες συμπεριλαμβανομένων των ρύπων, τις χουμικές ουσίες από το χώμα, τις πτητικές ουσίες που εκπέμπονται από τα φυτά, κ.λπ. Τα μεταβολικά ενεργά βιολογικά αερολύματα έχει γίνει γνωστό ότι καταναλώνουν ή/και αλλιώνουν τα χημικά συστατικά του αέρα. Οι φυσικές ιδιότητες των βιολογικών αερολυμάτων μπορούν επίσης να έχουν επιπτώσεις στον συντελεστή ανάκλασης του φωτός της ατμόσφαιρας και εμπλέκονται στο σχηματισμό σταγονιδίων στα νέφη και την κατάλυση του σχηματισμού πάγου, φαινόμενα που μπορούν να ασκήσουν επίδραση στις βροχοπτώσεις και άλλους τύπους κατακρημνήσεων. Η φύση και η αφθονία των κυρίαρχων βιολογικών αερολυμάτων πάνω από τις ηπείρους συνδέονται άμεσα με τη γεωργία και, σε ένα ευρύτερο πλαίσιο, με τη γενική κατανομή, την πυκνότητα και την ποικιλία των φυτικών επιφανειών. Ως εκ τούτου, με την κατανόηση των διαδικασιών που εμπλέκονται στη διασπορά των βιολογικών αερολυμάτων, της αλληλεπίδρασής τους με το ατμοσφαιρικό νερό και άλλες χημικές ουσίες, και του προκύπτοντος αντίκτυπου σε σημαντικές ατμοσφαιρικές διαδικασίες, θα ήταν εύλογο να συλληφθούν στρατηγικές χρήσης του εδάφους για να αλλάξουν αυτές τις επιδράσεις (π.χ., για να βελτιώσουν την ατμοσφαιρική ποιότητα ή για να μετριάσουν τα αποτελέσματα της ξηρασίας).

### 3.2.2. Εργαστηριακές μελέτες της παγοπυρήνωσης από βιολογικά μόρια.

Η δραστηριότητα παγοπυρήνωσης (IN) των βακτηριακών κυττάρων ερευνήθηκε σε εργαστηριακές μελέτες με διάφορες τεχνικές. Πρώιμη εργασία από τους Maki et al. (37) και Vali et al. (11) βρήκε ότι τα βακτήρια που σχετίζονται με φύλλα ή ζωικά απορρίματα προς αποσύνθεση, και κυρίως το είδος *P. syringae*, είναι ενεργά (IN) σε θερμοκρασίες υψηλές από -2 έως -4°C. Εντούτοις, βρέθηκε στην ίδια εργασία ότι υπάρχει μόνο 1 ενεργό μεταξύ 10.000 κυττάρων σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες. Η IN δραστηριότητα ήταν σχετική με τα άθικτα κύτταρα. Η υπερηχητική διάσπαση μετατόπισε την παγοπυρήνωση των ίδιων δειγμάτων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες μεταξύ -8 και -12°C. Οι Yankofsky et al. (92) ερεύνησαν την παγοπυρηνωτική δραστηριότητα διάφορων καλλιεργημένων βακτηρίων, αποκαλούμενα στελέχη M1 και M4 από το Ισραήλ, και τα είδη *Erwinia herbicola* και *P. syringae* από τις Ηνωμένες Πολιτείες. Σταγονίδια με όγκο 5 ml και περιέχοντας περίπου  $10^6$  κύτταρα από τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια παρουσίασαν ισχυρή παγοπυρηνωτική δραστηριότητα στις θερμοκρασίες μεταξύ των -2 και των -10°C, με τα M1 και M4 να είναι ενεργά σε κάπως υψηλότερες θερμοκρασίες από τα άλλα, πάντα όμως σε εξάρτηση με τις συνθήκες ανάπτυξης. Αποδείχθηκε ότι η παγοπυρήνωση μειώθηκε με την αραίωση των βακτηριακών αιωρημάτων ή τον τεμαχισμό των άθικτων κυττάρων στα αιωρήματα με την εφαρμογή υπερηχητικών παλμών των 20s. Η αραίωση σε ένα λόγο της τάξης του 100 μετατόπισε τις καμπύλες παγοπυρήνωσης του M1 σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες κατά 5°C. Αυτό δείχνει ότι μόνο ένα μικρό μέρος των IN κυττάρων είναι ενεργό στις υψηλότερες θερμοκρασίες, πράγμα που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες. Οι Yankofsky et al. (92) ταξινόμησαν σε τρεις ομάδες τις IN περιοχές: ενεργές σε θερμοκρασίες από -2 έως -4°C (ομάδα I), -5 έως -7°C (ομάδα II), και -8 έως -10 °C (ομάδα III). Η Ομάδα I φάνηκε ότι είναι η λιγότερο άφθονη (περίπου 1 παγοπυρηνωτικό κύτταρο στα  $10^4$ ) σε οποιοδήποτε πληθυσμό κυττάρων και απαιτούσε τα κύτταρα να είναι άθικτα, ενώ η αφθονότερη ομάδα III (μέχρι και 1 στα 300) παρατηρήθηκε επίσης στα ελεύθερα θραύσματα κυττάρων των βακτηριακών αιωρημάτων με τα τμήματα να έχουν μέγεθος περίπου 0.3 μm.

Οι Levin και Yankofsky (93) χρησιμοποίησαν την κάθετη σήραγγα αέρα του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας στο Λος Άντζελες (UCLA) για να ερευνησουν το βάπτισμα με βύθιση που προκαλείται από βακτήρια και την τήξη με επαφή σε

ελεύθερα αιωρούμενα σταγονίδια νερού με ακτίνα μεταξύ 220 και 360  $\mu\text{m}$ . Μια ξηρά σκόνη λυοφιλομένων βακτηρίων (τύπου M1, 93), που κονιοποιήθηκε μηχανικά σε γουδί, αιωρήθηκε απευθείας στη ροή αέρα της σήραγγας αέρα για τα πειράματα πυρήνωσης με επαφή ή χρησιμοποιήθηκε ως αιώρημα για να εμβάλει τα σταγονίδια για τα πειράματα τήξης με βύθιση. Η τήξη των σταγονιδίων παρατηρήθηκε στις θερμοκρασίες μεταξύ των  $-3$  και των  $-9^{\circ}\text{C}$ , με τη μέθοδο επαφής να είναι κάπως πιο ενεργή.

Οι Ward και DeMott (94) χρησιμοποίησαν την αίθουσα ελέγχου επέκτασης νεφών του κρατικού πανεπιστημίου του Κολοράντο (CSU) για να ερευνήσουν τη δραστηριότητα παγοπυρήνωσης του Snomax<sup>TM</sup>, ενός προϊόντος που έχει απομονωθεί και κατασκευαστεί από κύτταρα του *P. syringae* για την επαγωγή της παγοπύρηνωσης στο νερό με ψεκάσμο από ακροφύσια υψηλής πίεσης στις περιοχές σκι για την παραγωγή τεχνητού χιονιού, σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και κάτω από συνθήκες εξομοίωσης του σχηματισμού των νεφών. Αυτές οι μελέτες χρησιμοποίησαν διασπορές της κονιοποιημένης σκόνης των λυοφιλομένων βακτηρίων στον αέρα. Η συνεχής αλλαγή της δραστηριότητας της παγοπυρήνωσης κατά τη διάρκεια της ψύξης πακέτων νεφών ελέγχθηκε και επιβεβαίωσε κατά ένα μεγάλο μέρος τις συμπεριφορές που προσδιορίστηκαν από τους Levin και Yankofsky (93), συμπεριλαμβανομένων των αυξανόμενων ποσοστών παγοπυρήνωσης σε συνθήκες στενών ορίων της θερμοκρασίας.

Η παγοπυρηνωτική ικανότητα του Snomax ερευνήθηκε επίσης σε ένα πείραμα πύργου πτώσης σταγονιδίων στο πανεπιστήμιο της Ουάσιγκτον (95). Σταγονίδια διαμέτρου περίπου 33  $\mu\text{m}$  που λήφθηκαν από ένα διήθημα 0.2  $\mu\text{m}$  ενός αιωρήματος ενός σφαιριδίου Snomax<sup>TM</sup> σε 100 ml νερού παρουσίασαν ισχυρή δραστηριότητα παγοπύρηνωσης στις θερμοκρασίες κατωτέρω των  $-8^{\circ}\text{C}$  περίπου. Το φίλτρο συγκράτησε άθικτα κύτταρα μεγέθους γύρω στο 1  $\mu\text{m}$ . Αυτό σημαίνει ότι η παγοπύρηνωση προκλήθηκε από θραύσματα κυττάρων, σε λογική συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποίησαν επίσης δείγματα τεμαχισμένων κυττάρων. Τα μικρότερα θραύσματα παρουσίασαν παγοπυρηνωτική ικανότητα μόνο σε χαμηλότερη θερμοκρασία έναντι των μη φιλτραρισμένων δειγμάτων Snomax<sup>TM</sup> που χρησιμοποιήθηκαν από τους Ward και DeMott (94).

Πρόσφατα, η παγοπυρηνωτική ικανότητα μερικών στελεχών του *P. syringae* και του Snomax<sup>TM</sup> ερευνήθηκε στην επιχείρηση AIDA (Αλληλεπίδραση και δυναμική αερολύματος στην ατμόσφαιρα) του Forschungszentrum στην Καρλσρούη. Το



πλεονέκτημα του θαλάμου AIDA είναι ότι, αντίστοιχα με την αίθουσα νεφών του CSU, τα πειράματα μπορούν να πραγματοποιηθούν στις εξομοιωμένες συνθήκες νεφών και με τα βιολογικά μόρια να αιωρούνται άμεσα στη φάση αερολύματος. Ο θάλαμος AIDA χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των προηγούμενων χρόνων για πολυάριθμες μελέτες ετερογενούς παγοπύρηνωσης κυρίως με αερολύματα αιθάλης και ανόργανης σκόνης (96, 97). Εν συντομία, αιωρήματα καλλιεργημένων κυττάρων ή Snomax<sup>TM</sup> στο νερό ψεκάστηκαν άμεσα στο μεγάλο θάλαμο αερολύματος σε θερμοκρασίες μεταξύ -2 και -10°C. Οι συνακόλουθες κατανομές μεγέθους που μετρήθηκαν με ένα όργανο ανίχνευσης κινητικότητας και ένα φασματομέτρο αεροδυναμικού διαχωρισμού παρουσίασαν δύο ευδιάκριτες μοριακές καταστάσεις: μια στενή, σε σχήμα αιχμής σχεδόν, μονού διασκορπισμού των άθικτων κυττάρων με αεροδυναμικές διαμέτρους περίπου 0.8 μm, και μια κατάσταση πολυδιασκορπισμού από μικρότερα μόρια με διαμέτρους μεταξύ περίπου 0.01 και 0.5 μm, που τουλάχιστον στην περίπτωση των πειραμάτων με το Snomax<sup>TM</sup>, απαρτίζεται πιθανώς από υπολειμματικά μόρια εξατμιζόμενων σταγονιδίων ή περιέχει θραύσματα κυττάρων. Δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου ή πολύ μικρή INA σε θερμοκρασίες υψηλότερες των -8°C. Ακόμη και σε θερμοκρασίες κάτω από τους -10 °C μόνο ένα μικρό μέρος των βακτηριακών κυττάρων προκάλεσε παγοπύρηνωση με τις δύο παραπάνω μεθόδους. Το αερόλυμα Snomax<sup>TM</sup> έδειξε, μετά από την ενεργοποίηση των CCN, αύξηση της παγοπυρηνωτικής ικανότητας στη μέθοδο ψύξης με βύθιση στις θερμοκρασίες κατωτέρω των -8 °C, σε συμφωνία με την εργασία των Wood et al. (95).

Πόσο σημαντικά είναι τα βιολογικά αερολύματα για την έναρξη πάγου εξαρτάται από την ύπαρξη αποτελεσματικών μηχανισμών που μπορούν να παραδώσουν αυτά τα μεγαλύτερα μόρια στο επίπεδο των κρύων νεφών και από τις συγκεντρώσεις τους. Αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι είναι απαραίτητες υψηλές συγκεντρώσεις πυρήνων πάγου για να ασκηθεί ένα ισχυρό αντίκτυπο στην κατακρήμνιση. Η προσθήκη μεγάλων αριθμών πυρήνων πάγου στα κινούμενα νέφη μερικές φορές συνδέεται με τη μείωση της κατακρήμνισης (98), αν και ανατροφοδοτήσεις στη δυναμική των νεφών μπορεί να τροποποιήσουν άλλες ιδιότητες σχετικές με την παγκόσμια ενέργεια και τον κύκλο του νερού(99, 100). Αυτές και άλλες παρόμοιες μελέτες μοντέλων νεφών υπογραμμίζουν το γεγονός ότι η δράση των CCN, GCCN ή IN στα νέφη και την κατακρήμνιση δεν μπορούν να εξεταστούν σε απομόνωση, αλλά πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν το σύνολο των επιδράσεών τους.

### 3.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΓΟΠΥΡΗΝΩΣΗΣ.

#### 3.3.1. Δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης INA.

Όταν καθαρό νερό ψύχεται σε ατμοσφαιρική πίεση, δεν παγώνει αυθόρμητα στους 0°C. Εξαιτίας διακυμάνσεων της πυκνότητας του υγρού νερού, τα μόρια του σε συμπλέγματα με μοριακή διαρρύθμιση ίδια με αυτή των παγοκρυστάλλων προκαλούν διακύμανση στην ενέργεια. Αυτό ονομάζεται υπέρψυξη. Για μια σταγόνα καθαρού νερού από την οποία έχουν απομακρυνθεί τελείως όλα τα ξένα σωματίδια, η θερμοκρασία υπέρψυξης, που είναι και θερμοκρασία τήξης είναι περίπου οι -40°C. Η διαδικασία τήξης ονομάζεται ομογενής παγοπυρήνωση. Στην πράξη προσμίξεις ή ξένα σωματίδια που βρίσκονται συνήθως στο νερό, προσκολλώνται στην επιφάνεια των μορίων του νερού. Καθώς τα μόρια του νερού προσανατολίζονται με τρόπο που μοιάζει με πυρήνα πάγου, γίνονται συμβατά με την κρίσιμη διάσταση της παγοπυρήνωσης. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται ετερογενής παγοπυρήνωση και συμβαίνει πάντα σε θερμοκρασίες μεταξύ των -2°C και των -15°C.

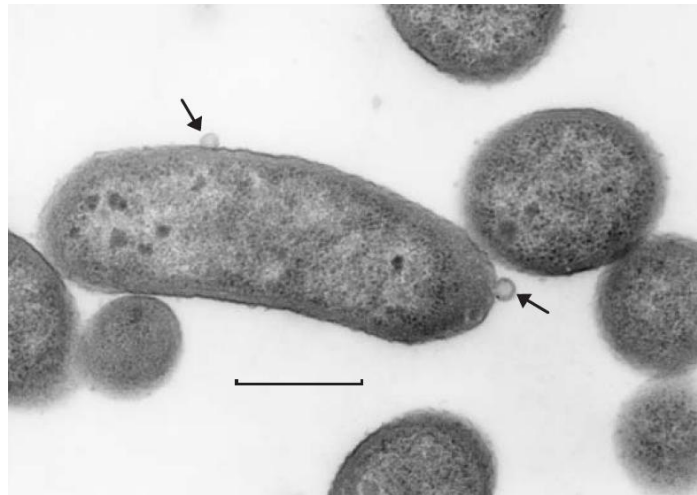
Έχουν βρεθεί τουλάχιστον έξι είδη παγοπυρηνωτικών βακτηρίων: *P. fluorescens* (101, 102), *P. syringae* (101), *P. viridiflava* (103), *E. herbicola* (101), *E. ananas* (101), *E. uredovora* (103), *X. campestris* (101). Μερικά στελέχη του *Fusarium* (105) και συγγενικά γένη μυκήτων είναι επίσης ενεργοί παγοπυρηνωτές. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να καταλύσουν σχηματισμό πάγου σε θερμοκρασίες που φτάνουν τους -2°C με -3°C, υποκεινόντας με αυτό τον τρόπο ζημιά παγετού σε πολλές σημαντικές καλλιέργειες.

Υπευθινά για την παγοπυρήνωση είναι πρωτεϊνικά μόρια και υλικά που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη αυτών των βακτηρίων. Δύο στελέχη του *P. fluorescens* (106) και της *E. uredovora* (107) έχει αναφερθεί ότι απελευθερώνουν τα εξωκυτταρικά παγοπυρηνωτικά υλικά στο αιώρημα της καλλιέργειας. Επίσης, πυρήνες πάγου ελεύθεροι από κύτταρα δύο στελεχών της *E. herbicola* (108) και της *E. carrotovora* (109) μπορούν να απελευθερωθούν στο αιώρημα της καλλιέργειας. Τα γονίδια που προσδίδουν την παγοπυρηνωτική ικανότητα έχουν αλληλουχηθεί από έξι βακτηριακά στελέχη και κωδικοποιούν για παγοπυρηνωτικές πρωτεΐνες (INPs) (120 ~ 180 kDa), με παρόμοιες πρωτογενείς δομές (101, 110). Μια INP αποτελείται από

παραπλήσιες επαναλήψεις ενός συνδετικού οκταπεπτιδίου (Ala-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-Leu-Thr). Επιπλέον, ο ενεργοποιητής της παγοπυρηνώσης που περιέχει μια INP αποτελείται από τρεις ευδιάκριτες δομές - μια μοναδική αμινοτελική περιοχή (~ 15% όλης της αλληλουχίας), η οποία είναι σχετικά υδρόφοβη και περιέχει το μεμβρανικό αγκυροβόλιο για την INP με ένα συσσωμάτωμα μαννάνης -φωσφατυδυλινοσιτόλης, μια μοναδική καρβοξυτελική περιοχή (~4%), η οποία είναι πλούσια σε βασικά υπολλείματα και πολύ υδρόφιλη και μια κεντρική επαναλαμβανόμενη περιοχή (περίπου το 80%), η οποία είναι υδρόφιλη και πλούσια σε αλανίνη, γλυκίνη, τυροσίνη, θρεονίνη, σερίνη και λευκίνη. Παρ' όλα αυτά, η καθαρισμένη INP εκδηλώνεται ως ενεργοποιητής παγοπυρηνώσης μόνο κάτω από τους  $-6^{\circ}\text{C}$ , που είναι περίπου  $4^{\circ}\text{C}$  χαμηλότερα από τη θερμοκρασία παγοπυρήνωσης ολόκληρων βακτηριακών κυττάρων (111). Αυτή η κατάπτωση της παγοπυρηνωτικής δραστηριότητας πιθανότατα οφείλεται στην προϋπόθεση παρουσίας φωσφολιπιδίων (112). Οι βακτηριακοί πυρήνες πάγου είναι λιπογλυκοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (113), και έχουν καταχωρηθεί ως τρεις χημικά διακριτές κατηγορίες έχοντας δομή: Α λιπογλυκοπρωτεΐνης, Β γλυκοπρωτεΐνης και Γ πρωτεΐνης (114). Επίσης, η παγοπυρηνωτική δραστηριότητα της Γ δομής προκλήθηκε από τη συσσωμάτωση των παγοπυρηνωτικών πρωτεϊνών, μια μοριακή μάζα πάνω από τα 1000 kDa (63). Ο Franks αναφέρει ότι οι αναγκαίοι παράγοντες για το σχηματισμό πυρήνων πάγου από υλικά, είναι οι τρεις παρακάτω: ομοιότητα με το κρυσταλλικό πλέγμα, έλλειψη επιφανειακών φορτίων και υψηλή υδροφοβικότητα (32). Η Α δομή ίσως να έχει τα παραπάνω χαρακτηριστικά.

Η εξωκυτταρική παγοπυρηνωτική ουσία που παράχθηκε από το στέλεχος της *E. uredovora* KUIN-3 (Εικόνα 2) καθαρίστηκε και χαρακτηρίστηκε ως σφαιρική ουσία (0.2 – 0.4  $\mu\text{m}$ ), η οποία έχει σύσταση λιπιδίου, πρωτεΐνης, σακχαρίτη και πολυαμίνης (64). Η πολυαμίνη λαμβάνει μέρος στη φόρτιση της επιφάνειας, στον έλεγχο της υδροφοβικότητας, στη σταθερότητα της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης στις δομές Α και Β στην εξωκυτταρική παγοπυρηνωτική ουσία και είναι κρίσιμο συστατικό και στις δύο δομές (115). Επίσης, έχει επιτευχθεί ο καθαρισμός της INP από την εξωκυτταρική παγοπυρηνωτική ουσία της *E. uredovora* και έχει υποτεθεί ότι η παγοπυρηνωτική της πρωτεΐνη είναι γλυκοπρωτεΐνη. Αν και αυτές οι εξωκυτταρικές παγοπυρηνωτικές ουσίες και κυτταρικές παγοπυρηνωτικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη και εκκρίνονται στο αιωρήμα της καλλιέργειας, δεν είχαν όλες οι πρωτεΐνες αλληλουχίες σήματος 15 έως 70 αμινοξικών υπολειμάτων στο

αμινοτελικό ακρό όμοιες με άλλες γνωστές αλληλουχίες σήματος. Οι Michigami et al. αναφέρουν ότι μετά τη συγκρότηση της INP κοντά στην εσωτερική μεμβράνη, αυτή εισέρχεται σε ένα κυστίδιο που μόλις έχει σχηματιστεί στην επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης και απομακρύνεται από την επιφάνεια και διαχέεται μαζί με την INP (116). Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, το συσσωμάτωμα της INP ως η μετάφραση του γονιδίου *ina* στο πλασμιδίό του (117) ή το κυστίδιο που περιλαμβάνει την INP στο *P. viridiflava* μεταφέρονται στην εξωτερική μεμβράνη. Πρόσφατα διασαφηνίστηκε ότι η ενέργεια του ATP είναι ουσιώδης για την έκκριση της εξωκυτταρικής παγοπυρηνωτικής ουσίας στο αιώρημα της καλλιέργειας (118). Λαμβάνοντας υπ' όψιν αυτά τα αποτελέσματα, μπορεί να προβλεφθεί ότι η έκκριση της INP ή της εξωκυτταρικής παγοπυρηνωτικής ουσίας μπορεί να είναι ένας μοναδικός μηχανισμός.



Εικόνα 2. Μικρογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης του παγοπυρηνωτικού βακτηρίου *Pseudomonas viridiflava* KUIN-3. Η μπάρα αντιστοιχεί σε 0.5μm. Τα βέλη στοχεύουν σε INP ή σε παγοπυρηνωτικό υλικό.

Η βακτηριακή παγοπυρήνωση παρέχεται από ένα και μόνο γονίδιο σε όλα τα παγοπυρηνωτικά βακτηρία που έχουν εξεταστεί και έχουν βρεθεί. Όλα τα γνωστά βακτηριακά γονίδια παγοπυρήνωσης έχουν κλωνοποιηθεί (49, 50). Αν και τα γονίδια παγοπυρήνωσης ποικίλλουν ελαφρώς στο μήκος, η γενική δομή τους είναι παρόμοια. Οι πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης από το *P. syringae* έχει αποδειχθεί ότι βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη (119, 120) και ότι απαιτούν περιβάλλον λιπιδίων για να λειτουργήσουν (112). Στο *E. herbicola* η παραγωγή των ενεργών κυστιδίων παγοπυρήνωσης της εξωτερικής μεμβράνης καταδεικνύει την θέση στο εξωτερικό της

μεμβράνης της πρωτεΐνης σε αυτό το είδος (121). Το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης είναι αρκετά υδρόφιλο, ειδικά η μεγάλη επαναλαμβανόμενη περιοχή και επομένως πιθανώς να βρίσκεται στην επιφάνεια της μεμβράνης.

Οι βακτηριακές πρωτεΐνες παγοπυρήνωσης βρίσκονται στη μεμβράνη και όταν καθαρίστηκε σε μια ενεργή μορφή η *inaZ* προερχόμενη από *P. Syringae*, που υπερεκφράστηκε σε *E. Coli*, φάνηκε ότι για να είναι ενεργή η πρωτεΐνη χρειάζεται την παρουσία λιπιδίων για να ανασυσταθεί ένα φυσιολογικό υδρόφοβο περιβάλλον παρόμοιο με το *in vivo* περιβάλλον, καθώς όταν έγινε κατεργασία της με φωσφολιπάση C έπαψε να είναι ενεργή και για να ανακτήσει την ενεργότητά της έπρεπε να εμπλουτιστεί με φωσφατιδυλεθανολαμίνη (149).

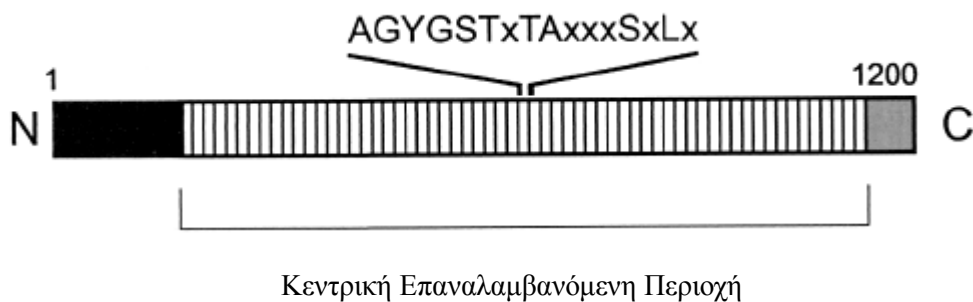
Όπως στην περίπτωση πολλών άλλων πρωτεϊνών, οι περισσότερες μελέτες των βακτηριακών πρωτεϊνών παγοπυρήνωσης είναι θεωρητικές και βασισμένες στις δομές που προέρχονται από την νουκλεοτιδική ακολουθία των κωδικοποιημένων γονιδίων. Επομένως πρέπει να στηριχθούμε συνήθως στην αφαιρετική εξαγωγή συμπεράσματος κατά την εξέταση της δομής αυτών των πρωτεϊνών. Το αφαιρετικό συμπέρασμα της δομής της πρωτεΐνης παγοπυρήνωσης διευκολύνεται από θεωρητικούς περιορισμούς που αφορούν στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Παραδείγματος χάριν, η θεωρία της παγοπυρήνωσης προτείνει ότι ένας αποδοτικός παγοπυρήνωτής πρέπει να ευθυγραμμίζει τα μόρια νερού σε ένα πλέγμα που μιμείται το σχήμα του πάγου.



Εικόνα 3. Χαρακτηριστικοί σχηματισμοί πάγου.

Επομένως πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα αμινοξικά υπολείμματα χωρισμένα σε κατάλληλα διαστήματα για να κάνουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια νερού. Η επαναλαμβανόμενη περιοχή της πρωτεΐνης ταιριάζει για αυτήν την λειτουργία. Περιέχει ιδιαίτερα συντηρημένα υπολείμματα που πιθανώς κάνουν δεσμούς υδρογόνου σε τακτά διαστήματα (122). Επιπλέον, η πολύ υψηλή θερμοκρασία

παγοπυρήνωσης του βακτηριακού παγοπυρηνωτή απαιτεί μεγάλο μέγεθος που πλησιάζει τα  $20 \times 10^6$  D στις υψηλότερες θερμοκρασίες (123). Επειδή ένα μονομερές της πρωτεΐνης παγοπυρήνωσης έχει μέγεθος περίπου 120.000 D, η θεωρία προβλέπει ότι το σύνολο της πρωτεΐνης παγοπυρηνώνει σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί από μελέτες αδρανοποίησης με γάμμα ακτινοβολία της πρωτεΐνης (63). Χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία γάμμα υψηλής ενέργειας για να αδρανοποιήσει την πρωτεΐνη, με το ποσοστό αδρανοποίησης θετικά συσχετισμένο με το μοριακό μέγεθος της λειτουργικής μονάδας. Η αδρανοποίηση με ακτινοβολία γάμμα υποδηλώνει ένα εύρος μεγέθους από 150 kDa για τους πυρήνες που είναι ενεργοί στους  $-12^\circ\text{C}$ , μέχρι 19.000 kDa για τους πυρήνες που είναι ενεργοί στους  $-2^\circ\text{C}$ . Η συσσωμάτωση της πρωτεΐνης έχει καταδειχθεί επίσης από την μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και την ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (125, 126). Στα παραπάνω πειράματα, παρατηρήθηκαν συσσωματώματα της πρωτεΐνης στην επιφάνεια των βακτηρίων που περιέχουν πυρήνες πάγου ενεργούς σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά ήταν απόντα από τα βακτήρια που είχαν πυρήνες ενεργούς μόνο στις πιο χαμηλές θερμοκρασίες. Οι αλγόριθμοι δευτεροβάθμιων δομών έχουν προβλέψει ότι τα μονομερή της πρωτεΐνης παγοπυρήνωσης έχουν μια δομή βήτα έλικας σε όλη την επαναλαμβανόμενη περιοχή. Αν και τα πρώτα πρότυπα της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών παγοπυρήνωσης έχουν χρησιμοποιήσει μερικούς περιορισμούς που επιβάλλονται από την ασυνήθιστη λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης, αυτά αναπτύχθηκαν προτού καθοριστεί ότι η πρωτεΐνη διαμορφώνει συσσωματώματα (126, 127).



Εικόνα 4. Δομή και ακολουθία επαναλαμβανόμενων περιοχών στην INP του *P. syringae*. Τα κιβώτια δείχνουν τη διαρρύθμιση των περιοχών της πρωτεΐνης με τη N-τελική περιοχή να παρουσιάζεται με μαύρο, η C-τελική περιοχή με γκριζό, και οι 61 επαναλήψεις των 16 υπολειμμάτων με άσπρα κιβώτια (127).

Αυτά τα πρότυπα δεν επέτρεπαν το στενό πακετάρισμα της πρωτεΐνης παγοπυρήνωσης σε δομές υψηλότερης τάξης που είναι απαραίτητες για ένα σταθερό πρότυπο ικανό να μιμηθεί τον πάγο. Επιπλέον, οι κοιλότητες που προτάθηκαν στα προηγούμενα πρότυπα των πρωτεϊνών παγοπυρήνωσης περιείχαν ακόρεστους δεσμούς υδρογόνου. Τα πιο πρόσφατα πρότυπα προσπαθούν να λάβουν υπόψη αυτές τις ιδιότητες. Ένα τέτοιο πρότυπο έχει προταθεί από τους Kajava και Lindow (128). Προτείνεται ότι η επαναλαμβανόμενη δομή της πρωτεΐνης αποτελείται από μια σειρά βήτα φουρκετών, όπου κάθε μία καθορίζεται από επαναλήψεις δύο οκταπεπτιδίων. Οι ορθογόνιες μονάδες που διαμορφώνονται από ομάδες τριών ή περισσότερων δομών φουρκετών θα είχαν τη δυνατότητα να αλληλεμπλέκονται, διαμορφώνοντας μεγάλα επίπεδα συσσωματώματα. Το πρότυπο είναι σύμφωνο με τον ευρέως αποδεκτό ρόλο της επαναλαμβανόμενης περιοχής ως πρότυπο για την έναρξη του σχηματισμού ενός πυρήνα πάγου (129). Η αλληλεπίδραση των 48 αμινοξικών μονάδων όχι μόνο θα σταθεροποιούσε τη δομή της πρωτεΐνης, αλλά θα επέτρεπε επίσης ποσοτικές αυξήσεις στην παρακείμενη περιοχή του προτύπου σύνδεσης υδρογόνου. Οι άμινο- και καρβοξυτελικές περιοχές της πρωτεΐνης ίσως να διαμορφώνουν άλφα έλικα και βήτα δομές, με την κάπως υδρόφοβη αμινοτελική περιοχή ενδεχομένως να αγκυροβολεί την πρωτεΐνη στη μεμβράνη.

Αν και το επαναλαμβανόμενο μέρος των πρωτεϊνών πάγου έχει έναν λογικό και άμεσο ρόλο στην κατάλυση πάγου, λιγότερα είναι γνωστά για το ρόλο του υπόλοιπου μορίου. Η μεταλλακτική ανάλυση ορίζει διάφορες πιθανές λειτουργίες για τις άμινο- και καρβοξυτελικές περιοχές (130). Η αμινοτελική περιοχή, εκτός από την πιθανή λειτουργία της στην εξαγωγή της πρωτεΐνης στην εξωτερική μεμβράνη, φαίνεται να έχει έναν ρόλο στο σχηματισμό μικρών συσσωματωμάτων. Εντούτοις, κανένα δομικό πρότυπο δεν εξηγεί επί του παρόντος πώς μπορεί να πραγματοποιηθεί η συσσωμάτωση δύο ή περισσότερων μονομερών. Οι Kajava και Lindow (128) δεν εξετάζουν τους προφανώς ουσιαστικούς ρόλους της άμινο- και της καρβοξυτελικής περιοχής (131). Έχει προταθεί ότι η καρβοξυτελική περιοχή μπορεί να διευκολύνει το δίπλωμα της πρωτεΐνης (49). Το πρότυπο των Kajava και Lindow προτείνει ότι η ίδια η επαναλαμβανόμενη περιοχή είναι τουλάχιστον μερικώς αρμόδια για τη σταθεροποίηση των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης. Αυτό είναι αντίθετο προς τις πρόσφατες προτάσεις (49, 130) ότι η αμινοτελική περιοχή με τη μοναδική ακολουθία, ενδεχομένως με κάποια συμβολή από τη καρβοξυτελική περιοχή (130), είναι αρμόδια για τη συσσωμάτωση. Εντούτοις, πρόσφατη εργασία (132) που εξετάζει μεταλλαγές

αλλαγής μιας βάσης που παράγουν παγοπυρηνωτικά πρωτεϊνικά μόρια που φαίνεται να είναι ελαττωματικά στο σχηματισμό συσσωματωμάτων (δηλ., εκδηλώνουν μείωση της παγοπυρήνωσης μόνο σε θερμές θερμοκρασίες) διαπίστωσε ότι όλες αυτές οι μεταλλαγές βρέθηκαν στην επαναλαμβανόμενη περιοχή της πρωτεΐνης. Η αναθεώρηση προηγούμενης εργασίας αποκαλύπτει ότι αν και διαγραφές στην αμινοτελική περιοχή μπορούν επιλεκτικά να μειώσουν ή να εξαλείψουν τη δραστηριότητα παγοπυρήνωσης σε υψηλή θερμοκρασία, ορισμένες διαγραφές που διασπών το τακτικό μοτίβο επανάληψης στην επαναλαμβανόμενη περιοχή επίσης επιλεκτικά μειώνουν τη δραστηριότητα παγοπυρήνωσης υψηλής θερμοκρασίας, δίνοντας έναν φαινότυπο παρόμοιο με εκείνους που παρατηρούνται στις μεταλλάξεις μοναδιαίας αλλαγής βάσης (130). Οι φαινότυποι των μεταλλάξεων στο αμινοτελικό άκρο και στις επαναλαμβανόμενες περιοχές διαφέρουν ελαφρώς, εντούτοις, με την δραστηριότητα παγοπυρήνωσης υψηλότερης θερμοκρασίας να παραμένει στις μεταλλάξεις της επαναλαμβανόμενης περιοχής. Αυτό υποδεικνύει ότι ίσως να απαιτούνται δύο περιοχές της πρωτεΐνης για το σχηματισμό συσσωματωμάτων διαφορετικού μεγέθους.

Για να βελτιστοποιηθεί η ικανότητα παγοπυρήνωσης των βακτηριακών πυρήνων πάγου είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό πώς διαμορφώνονται και σταθεροποιούνται οι πυρήνες πάγου υψηλής θερμοκρασίας. Αυτό χρήζει ιδιαίτερης προσοχής επειδή οι πυρήνες υψηλής θερμοκρασίας είναι γενικά λιγότερο σταθεροί από τους πυρήνες χαμηλής θερμοκρασίας (65, 114, 133). Μέρος του λόγου για τη μεγαλύτερη αστάθεια των πυρήνων πάγου υψηλής θερμοκρασίας προκύπτει από τη διάσπαση των συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης παγοπυρήνωσης. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι οι βακτηριακοί πυρήνες πάγου υψηλής θερμοκρασίας είναι ασταθείς πάνω από τους 25°C (64, 65). Χαμηλώνοντας τις θερμοκρασίες υπό συνθήκες που είναι απίθανο να επιτρέψουν σημαντικά ποσοστά μεταβολισμού αυξάνουν εντυπωσιακά τον αριθμό πυρήνων υψηλής θερμοκρασίας σε ένα αιώρημα κυττάρων, πράγμα που υπονοεί την επανασυσσωμάτωση της πρωτεΐνης στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (64, 65). Επί του παρόντος δεν είναι γνωστό εάν αυτή η επίδραση της θερμοκρασίας οφείλεται στην εγγενή αστάθεια των συσσωματωμάτων, που απεικονίζει είτε τη δύναμη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μονομερών είτε της αλλαγής στη δομή της μεμβράνης στις διαφορετικές θερμοκρασίες, είτε και τα δύο. Κάποιοι μεμβρανικοί διασπαστές όπως η φωσφολιπάση CII και η 2-φαινυλεθανόλη επίσης μειώνουν επιλεκτικά την ικανότητα



παγοπυρήνωσης υψηλής θερμοκρασίας (65, 114). Αυτό το φαινόμενο, μαζί με άλλα στοιχεία όπως η παρουσία μικρών ποσών φωσφατιδυλινοσιτόλης στα παγοπυρηνωτικά στελέχη, μπορεί να δείξει ότι αυτό το φωσφολιπίδιο είναι συστατικό των πυρήνων πάγου υψηλής θερμοκρασίας (134), αλλά μπορεί επίσης να υποδηλώσει έμμεσα αποτελέσματα που παράγονται από αυτό το μεμβρανικό συστατικό. Σε πειράματα όπου απολιπιδωμένοι πυρήνες πάγου ανασυγκροτήθηκαν με μεμβρανικά λιπίδια, μόνο χαμηλής θερμοκρασίας παγοπυρηνωτική δραστηριότητα μπόρεσε να ανακτηθεί (κάτω από τους  $-7^{\circ}\text{C}$  (112)). Είναι ενδιαφέρον ότι μπόρεσε να ανακτηθεί δραστηριότητα παγοπυρήνωσης στους  $-9^{\circ}\text{C}$ , καθώς αυτό δείχνει ότι αποκαταστάθηκαν ολιγομερή δύο ή τριών υπολειμμάτων σε αυτά τα πειράματα. Αυτό μπορεί να δείξει είτε ότι ένα πρόσθετο μεμβρανικό τμήμα ή η γενική δομή της μεμβράνης, που χάνεται κατά τη διάρκεια της απολιπίδωσης, είναι απαραίτητα για τη διαμόρφωση μεγαλύτερων συσσωματωμάτων ή ότι τα μεγαλύτερα συσσωματώματα μπορούν να διαμορφωθούν με μια ενεργό διαδικασία. Αυτό θα στήριζε την υπόθεση ότι οι πυρήνες που είναι ενεργοί ανωτέρω και κατωτέρω περίπου των  $-8^{\circ}\text{C}$  έχουν διαφορετικές δομές (114) ή εξαρτώνται από διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης (δείτε ανωτέρω) για τη δραστηριότητά τους. Οι προτάσεις ότι τα μεγάλα συσσωματώματα παγοπυρηνωτικής πρωτεΐνης έχουν πρόσθετα απαραίτητα συστατικά, όπως φωσφατιδυλινοσιτόλη ή μανόζη (114), που συσχετίζονται μαζί τους απαιτούν περαιτέρω πειραματική υποστήριξη, αν και μπορεί να είναι δύσκολο να απομονωθούν τμήματα που συνδέονται ομοιοπολικά με ένα δευτερεύον συστατικό μιας δευτερεύουσας μεμβρανικής πρωτεΐνης.

Η περαιτέρω μελέτη των μεταλλαγών σε ένα μόνο αμινοξύ της πρωτεΐνης που μειώνουν επιλεκτικά την παγοπυρήνωση υψηλής θερμοκρασίας μπορεί να αποκαλύψει αλλαγές ικανές να τροποποιηθούν στην πρωτεΐνη για να αυξήσουν τη σταθερότητα των μεγάλων συσσωματωμάτων ή να δημιουργήσουν μεγαλύτερους αριθμούς συσσωματωμάτων ανά κύτταρο. Επίσης είναι δυνατό να δημιουργηθούν παγοπυρηνωτικές πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να διαμορφώσουν συσσωματώματα ακόμα μεγαλύτερα και ενεργά σε θερμοκρασίες πάνω από τους  $-2^{\circ}\text{C}$ . Το πιο πρόσφατο πρότυπο των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων παγοπυρήνωσης δεν προτείνει θεωρητικό όριο για το μέγεθος των πυρήνων (132). Εντούτοις, καθώς τα προκύπτοντα συσσωματώματα θα ήταν εξαιρετικά μεγάλα, ίσως να μην μπορούν να φιλοξενηθούν από τα βακτηριακά κύτταρα. Θα μπορούσε να υποστηριχτεί ότι υπάρχει ένα εγγενές όριο στη σταθερότητα των μεγάλων συσσωματωμάτων, καθώς

τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια πιθανώς έχουν επιλέξει τις παγοπυρηνωτικές πρωτεΐνες με τη βέλτιστη σταθερότητα. Εντούτοις, οι μεγάλοι πυρήνες είναι σταθεροί σε θερμοκρασίες κάτω από τους 20°C (64, 65), όπως θα τους συναντούσαμε υπό συνθήκες χαρακτηριστικές στον αγρό, έτσι μπορεί να μην έχει υπάρξει καμία πίεση να εξελιχθούν οι παγοπυρηνωτικές πρωτεΐνες σε σταθερότερες μορφές από τις ήδη υπάρχουσες.

Η πίεση επιλογής μπορεί να εμφανιστεί κατά το σχηματισμό μεγάλων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων παγοπυρήνωσης και μπορεί να υποδεικνύει ένα βιολογικά επιβληθέν όριο στο μέγεθος των πυρήνων πάγου υψηλής θερμοκρασίας. Ο Mueller και οι συνεργάτες του (124) εξέτασαν τη συσσωμάτωση της παγοπυρηνωτικής πρωτεΐνης με *in situ* σήμανση με ανοσοφθορισμό. Διαπίστωσαν ότι μόνο τα κύτταρα που εκφράζουν πυρήνες πάγου υψηλής θερμοκρασίας παρουσίασαν τμήματα φθορισμού, ενδεικτικά της παρουσίας συσσωματωμάτων. Τα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν τμήματα φθορισμού κάμφθηκαν ανώμαλα προς αυτά τα τμήματα, κάτι που προτείνει ότι άλλαξε η δομή των μεμβρανών, πράγμα που μπορεί να έχει επιπτώσεις στην φυσική κατάσταση των κυττάρων. Η μειωμένη υγεία των βακτηριακών κυττάρων που κατέχουν τους πυρήνες πάγου υψηλής θερμοκρασίας δεν υπονοεί τη μειωμένη υγεία για ολόκληρο τον πληθυσμό των βακτηρίων, δεδομένου ότι ένα μικρό μέρος των κυττάρων εκφράζει τους πυρήνες πάγου υψηλής θερμοκρασίας σε μία δεδομένη στιγμή. Επιπλέον, τα τμήματα που εξετάστηκαν σε αυτήν την εργασία πιθανώς δεν αντιπροσωπεύουν πυρήνες που είναι ενεργοί στις υψηλότερες θερμοκρασίες παγοπυρήνωσης (περίπου -3°C σε αυτή τη μελέτη) καθώς μόνο ένα κύτταρο ανά 10<sup>2</sup> ή 10<sup>3</sup> κύτταρα που εκφράζουν πυρήνες στους -5°C εκφράζουν πυρήνες ενεργούς στους -3°C. Πυρήνες ενεργοί στους -2°C προβλέπεται ότι είναι τριπλάσιοι ή τετραπλάσιοι σε μέγεθος από πυρήνες ενεργούς στους -5°C, ή αλλιώς ότι έχουν περίπου 45 nm διάμετρο (123), και εμφανίζουν ακόμη δριμύτερες μορφολογικές αλλαγές. Πρέπει να καταστεί σαφές, εντούτοις, ότι δεν υπάρχουν άμεσα στοιχεία ότι τα κύτταρα που κατέχουν τους πυρήνες υψηλής θερμοκρασίας είναι λιγότερο υγιή από τα άλλα. Είναι δυνατό η παρατηρηθείσα κυρτότητα να οφείλεται στο μαρκάρισμα του αντισώματος ή ότι αυτή η κυρτότητα και οι ελλοχεύουσες δομικές αλλαγές δεν μειώνουν την υγεία των κυττάρων. Επιπλέον, σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα της *Escherichia coli* αντί του *P. syringae*. Θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστούν κύτταρα αμαρκάριστα για να δούμε εάν μερικά είναι κυρτά υπό συνθήκες που επιτρέπουν την παγοπυρήνωση υψηλής

θερμοκρασίας, και εάν τέτοια κύτταρα διαιρούνται με φυσιολογικό ρυθμό και είναι κατά τα άλλα τυπικά (παραδείγματος χάριν, εάν παρουσιάζουν κανονική κινητικότητα, κ.λπ.). Εάν η βακτηριακή παγοπυρήνωση έχει οποιοδήποτε κόστος στη φυσική κατάσταση, πρέπει να ισορροπείται από τα οφέλη που παρέχει στα κύτταρα όπως είναι η γρήγορη απομάκρυνση από την ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια των κατακρημνήσεων ή η διευκόλυνση στην εισβολή των φυτών κατά τη διάρκεια της παθογένεσης (5, 6, 135).

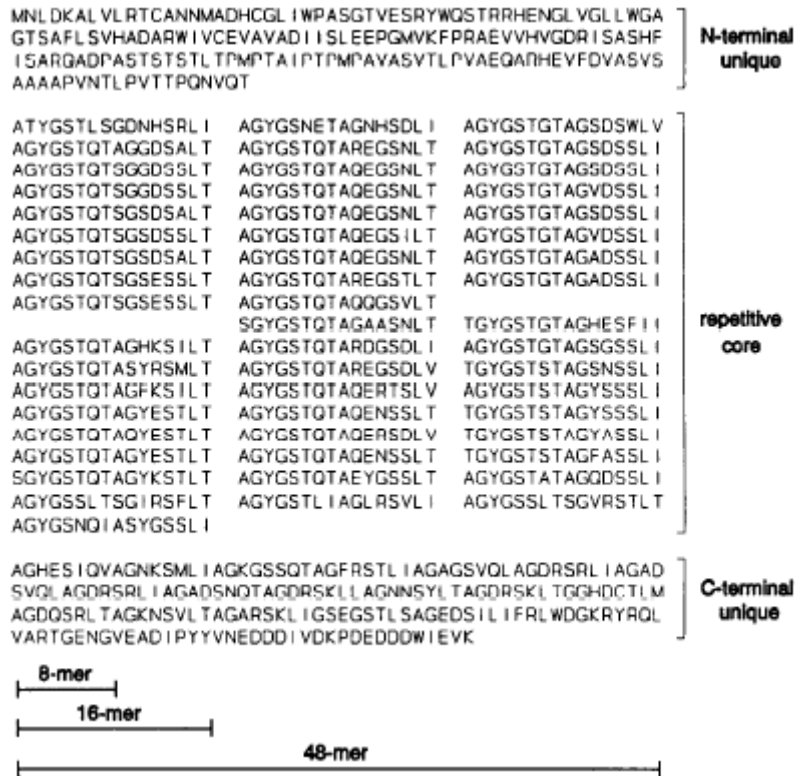
### 3.3.2. Ασυνήθιστα μοτίβα της εξέλιξης του βακτηριακού γονιδίου παγοπυρήνωσης.

Η γενετική βάση για την παγοπυρήνωση στα βακτήρια είναι ένα μοναδικό χρωμοσωμικό γονίδιο, το *ina*, το οποίο είναι απαραίτητο και επαρκές για τον παγοπυρηνωτικό φαινότυπο (136, 137). Μέχρι σήμερα, τα γονίδια *ina* (εναλλακτικά αποκαλούμενα *ice* σε ένα είδος) έχουν κλωνοποιηθεί και αλληλουχηθεί σε πέντε είδη: το *inaZ* από το *P. syringae* (129), το *inaW* από το *Pseudomonas fluorescens* (138), το *iceE* από την *E. herbicola* (122), το *inaA* από την *Erwinia ananas* (131), και το *inaX* από παθογενή μεταλλάγματα του *Xanthomonas campestris* (139). Το ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο αυτού του γονιδίου είναι εντόνως συντηρημένο στα πέντε είδη και αποτελείται από μια αξιολογούμενη επαναλαμβανόμενη κεντρική περιοχή που πλαισιώνεται από μοναδικές 5' και 3' ακολουθίες (Εικόνα 5).

Η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου όπου θεωρείται ότι λειτουργεί διπλώνοντας έτσι ώστε να μιμείται την εξαμερή δομή του πάγου (138). Δεν έχει προσδιοριστεί άλλη λειτουργία για τις πρωτεΐνες *Ina*.

Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες πτυχές των παγοπυρηνωτικών βακτηρίων είναι η ασυνήθιστη κατανομή του φαινότυπου. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η παγοπυρηνωτική ικανότητα βρίσκεται σε είδη των τριών γενών: *Erwinia*, *Pseudomonas*, και *Xanthomonas* εντούτοις, δεν παρουσιάζουν όλα τα είδη σε αυτά τα γένη παγοπυρηνωτικό φαινότυπο. Φαίνεται ότι η παγοπυρηνωτική ικανότητα περιορίζεται μόνο στα *E. ananas*, *E. uredovora*, *E. herbicola*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, και *X. campestris* (135). Περαιτέρω, μέσα σε αυτά τα έξι είδη, δεν μοιράζονται όλα τα στελέχη τον παγοπυρηνωτικό φαινότυπο (135). Η φαινοτυπική

κατανομή της παγοπυρηνωτικής ικανότητας υποδεικνύει ότι το γονίδιο *ina* μπορεί να έχει ακολουθήσει μια ασυνήθιστη εξελικτική πορεία.



Εικόνα 5. Προβλεφθήσα αμινοξική αλληλουχία του *inaZ* του *P. syringae* (138). Υπάρχουν τρία επίπεδα περιοδικότητας στον επαναλαμβανόμενο πυρήνα ως αποτέλεσμα μονής, διπλής και εξαπλής ατελούς επανάληψης του συναινετικού οκταμερούς πεπτιδίου AGYGSTLT. Ένα κενό εισάχθηκε στην αλληλουχία για να ευθυγραμμίσει τρεις τάξεις δεκαεξαμερών επαναλήψεων.

Διάφορα ενδιαφέροντα σενάρια θα μπορούσαν να εξηγήσουν την εξέλιξη της βακτηριακής παγοπυρηνωτικής ικανότητας. Κατ' αρχάς, ίσως το γονίδιο *ina* να ήταν παρόν στον κοινό πρόγονο των παγοπυρηνωτικών ειδών και στη συνέχεια να χάθηκε σε μερικές γενεαλογίες. Αυτό θα μπορούσε να υπονοήσει ότι τα βακτήρια έχουν αναπτύξει έναν μηχανισμό για τη συντήρηση μίας συνθήκης διμορφισμού όσον αφορά την παρουσία ή απουσία του γονιδίου *ina*. Αν και είναι θεωρητικά πιθανό, δεν γνωρίζουμε κανένα παράδειγμα τέτοιου είδους συνεχούς διμορφισμού. Δεύτερον, τα γονίδια *ina* ίσως να έχουν μεταφερθεί οριζόντια σε ένα ή περισσότερα από τα παγοπυρηνωτικά βακτηριακά είδη. Αυτό έχει τεθεί ως αξίωμα από τους Warren και Wolber (140). Τρίτον, το *ina* γονίδιο μπορεί να έχει δημιουργηθεί ανεξάρτητα στα

παγοπυρηνωτικά βακτήρια. Αυτό είναι εξαιρετικά απίθανο λόγω της έντονα συντηρημένης φύσης των γονιδιακών ακολουθιών.

### 3.3.3. Εφαρμογές των βακτηριακών πυρήνων πάγου.

Η δραστηριότητα σχηματισμού πυρήνων πάγου είναι χρήσιμη ως βάση για ένα νέο σύστημα γονιδίων αναφοράς με το οποίο ένα γονίδιο παγοπυρήνωσης δίχως τον υποκινητή του συνδέεται με ένα γονίδιο που μας ενδιαφέρει για να ελεγχθεί η μεταγραφική δραστηριότητά του. Η δραστηριότητα παγοπυρήνωσης μπορεί να ποσοτικοποιηθεί εύκολα με μια δοκιμή πήξης σταγόνων, στην οποία περιβαλλοντικά δείγματα αιωρούνται χωρίς προγενέστερη προετοιμασία σε ένα υδατικό διάλυμα, τα μικρά σταγονίδια από τις διαλύσεις των αιωρήσεων ψύχονται σε θερμοκρασία  $-5^{\circ}\text{C}$  και το κλάσμα των σταγονιδίων που παγώνουν καταγράφεται (62). Στους  $-5^{\circ}\text{C}$ , υπάρχει ελάχιστη ή καθόλου δραστηριότητα παγοπυρήνωσης στο αιώρημα εδάφους ή σε άλλα περιβαλλοντικά δείγματα που έχουν εξεταστεί (62). Περαιτέρω, σωματίδια εδάφους, φυτικός ιστός, και άλλα συστατικά σε περιβαλλοντικά δείγματα δεν παρεμποδίζουν τις μετρήσεις της δραστηριότητας της παγοπυρήνωσης. Η έκφραση της δραστηριότητας παγοπυρήνωσης στα βακτήρια δεν είναι ενεργοβόρα. Περίπου 300 πρωτεϊνικά μόρια IceC παράγονται ακόμη και σε ενεργά κύτταρα των *P. syringae* (119). Κατά συνέπεια η έκφραση της δραστηριότητας παγοπυρήνωσης δεν απαιτεί τα κύτταρα να είναι ιδιαίτερα ενεργά μεταβολικά ούτε αλλάζει σημαντικά την ανάπτυξη ή την επιβίωση των κυττάρων σε περιβάλλοντα με χαμηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά.

Οι συγχωνεύσεις του *lux* οπερονίου, που χρησιμοποιείται συχνά ως γονίδιο αναφοράς, για να στοχεύει γονίδια υπολογίζεται ότι είναι περίπου 1.000 φορές πιο ευαίσθητες στην ανίχνευση της δραστηριότητας γονιδίων από τις αντίστοιχες συγχωνεύσεις γονιδίων *lacZ* (142). Οι συγχωνεύσεις γονιδίων παγοπυρήνωσης, αφ' ετέρου, είναι περίπου 100.000 με 1.000.000 φορές πιο ευαίσθητες στη μέτρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας γονιδίων στόχων από τις αντίστοιχες *lacZ* συγχωνεύσεις (143). Έτσι το σύστημα γονιδίων αναφοράς παγοπυρήνωσης έχει μια ουσιαστικά υψηλότερη ευαισθησία και πάσχει λιγότερο από την παρέμβαση συστατικών περιβαλλοντικών δειγμάτων από άλλα γονίδια αναφοράς.

Έχει παραχθεί ένας κατάλληλος φορέας, το Tn3-Spice, για να εισάγει ένα γονίδιο παγοπυρήνωσης δίχως τον υποκινητή του από τα *P. syringae* (το *inaZ*) στα κλωνοποιημένα γονίδια (143). Αυτό το σύστημα γονιδίων αναφοράς παρέχει την ευκαιρία να μετρηθεί η δραστηριότητα των γονιδίων που έχουν ενδιαφέρον σε φυσικά ενδιαιτήματα (143). Αυτό το σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει την έκφραση φυτοεπηρεαζόμενων γονιδίων εμπλεκόμενων στην φυτοπαθογένεση (143, 144) και την αίσθηση της διαθεσιμότητας των ιόντων σιδήρου στα φυτά και στο έδαφος χρησιμοποιώντας συγχωνεύσεις με ένα γονίδιο-υποκινητή ρυθμιζόμενο από το σίδηρο (33). Δεδομένου ότι το *inaZ* μεταγράφεται και παράγει λειτουργικούς πυρήνες πάγου σε μια ευρεία ομάδα gram-αρνητικών βακτηρίων (143) και φυτών (106), είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια ευρεία σειρά προκαριωτικών και ευκαριωτικών συστημάτων.

Τα γονίδια παγοπυρήνωσης έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για να αναπτύξουν γρήγορες και ευαίσθητες δοκιμές για παθογόνα βακτήρια. Σε τέτοιες δοκιμές, αξιοποιείται η δυνατότητα ενός βακτηριοφάγου συγκεκριμένου οργανισμού που παροδικά μετασχηματίζει το στέλεχος σε έναν παγοπυρήνωτικό φαινότυπο (141). Επειδή τα περισσότερα δείγματα νερού και τροφίμων που θα αναλύονταν για την παρουσία ανθρώπινων παθογόνων είναι απαλλαγμένα της δραστηριότητας παγοπυρήνωσης σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τους  $-5^{\circ}\text{C}$ , η παρουσία ακόμη και μικρού αριθμού παθογόνων βακτηρίων μπορεί να διαγνωσθεί από την παγοπυρήνωση κατά τη μόλυνσή τους από τον ανασυνδυασμένο βακτηριοφάγο με ευρεία ακτίνα ξενιστών που περιέχουν γονίδιο παγοπυρήνωσης (141). Υπάρχουν πολλές δυνατότητες για περαιτέρω χρήσεις μεθόδων ανίχνευσης βασισμένες στην παγοπυρήνωση.

### 3.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.

Ο σκοπός αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης είναι διπλός. Το πρώτο μέρος της αναλώνεται γύρω από τη συλλογή δειγμάτων τόσο από γεωργικά όσο και από μη γεωργικά ενδιαιτήματα, με σκοπό την επιβεβαίωση της παρουσίας παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε αυτά. Δείγματα θα παρθούν από τα φύλλα και τη ριζόσφαιρα καλλιεργούμενων φυτικών ειδών και η παρουσία των ανωτέρω βακτηρίων, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ακμάζουν σε τέτοια περιβάλλοντα, θα επιβεβαιωθεί.

Στη συνέχεια θα παρθούν δείγματα νερού και χιονιού από περιοχές ελευθères της ανθρώπινης παρέμβασης και θα φανεί ότι και σε αυτές τις περιοχές τα παγοπυρηνωτικά βακτήρια μπορούν να βρεθούν και πάλι.

Το δεύτερο μέρος της μελέτης θα εξερευνήσει την δυνατότητα κάποιων μεθόδων να ανιχνεύσουν την παρουσία παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε άγνωστα δείγματα τόσο νερού όσο και εδάφους.

Επιχειρήθηκε να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ανίχνευσης με ανοσοφθορισμό, μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την επισήμανση της παρουσίας μικροοργανισμών ιατρικής ή φυτοπαθολογικής σημασίας. Στη συνέχεια θα έχει σειρά η προσπάθειά μας να πετύχουμε ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών διαφόρων γονιδίων *Ipa*. Τέλος θα επιχειρήσουμε να απομονώσουμε ολικό DNA από περιβαλλοντικό δείγμα για ανίχνευση γονιδίων *Ipa*.

#### 4.1. Καταμέτρηση πληθυσμών ολικών και παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε περιβαλλοντικά δείγματα από διαφορετικά ενδιαιτήματα.

Οι πληθυσμοί των ολικών και παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε διάφορα ενδιαιτήματα υπολογίστηκαν σε δείγματα φύλλων εσπεριδοειδών και ελιάς, ριζόσφαιρας σίτου και εδάφους μακριά από φυτά, καθώς και νετού(βροχή, χιόνι) και επιφανειακών υδάτων.

Στην περίπτωση στερεού δείγματος, σε αποστειρωμένη κωνική, που περιέχει 50 ml 10mM pH buffer, προστέθηκαν 5 gr του δείγματος και έγινε έντονη και με διάρκεια ανατάραξη για να αποσπασθούν τα υπάρχοντα βακτήρια.

Στη συνέχεια έγιναν δεκαδικές αραιώσεις μέχρι τη  $10^{-4}$  από τις οποίες απλώθηκαν 100μl σε ένα τρυβλίο, όπως φαίνεται στην εικόνα 6.

Οι διαδοχικές αραιώσεις αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με υλικό TSA για τη μέτρηση της ολικής πανίδας και σε υλικό KBC για τη μέτρηση των φθοριζουσών αποικιών. Οι μετρήσεις γίνονταν κατά την 3<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα και ενώ τα τρυβλία ήταν σε επωαστικό θάλαμο στους 28°C.

Στην πορεία των μετρήσεων το KBC αντικαταστάθηκε με το KB+ γιατί φάνηκε ότι το πρώτο ήταν πολύ εκλεκτικό και χάνονταν αποικίες που με το δεύτερο καταφέραμε να απομονώσουμε

Μετά την επώαση εξετάστηκαν οι αποικίες στο KB+ και επελέγησαν αυτές που παρήγαγαν φθορίζουσα χρωστική, μετά από εξέταση με λάμπα UV. Οι αποικίες αυτές καθαρίστηκαν περαιτέρω και αποθηκεύθηκαν στη συλλογή.





Εικόνα 6. Διαδοχικές αραιώσεις απλωμένες σε τρυβλίο για τον καθαρισμό, την απομόνωση και τελικά την αποθήκευση των αποικιών που βρέθηκαν στα υπό εξέταση δείγματα.

Αρχικά έμειναν σε επωαστικό θάλαμο στους 28°C για δύο ημέρες και στην συνέχεια έγινε conditioning στους 4 °C για 4 και για 7 ημέρες, σε δύο διαφορετικά πειράματα αντίστοιχα. Από το τρυβλίο λάβαμε μικρή ποσότητα από την ανεπτυγμένη αποικία με γάντζο και αιωρήσαμε σε erpendorf με 1ml αποστειρωμένο νερό. Με την πρώτη δεκαδική αραιώση και χρησιμοποιώντας τα σκαφάκια κάναμε δοκιμή παγοπυρήνωσης με τον ίδιο τρόπο που χρησιμοποιήσαμε στην περίπτωση των στελεχών της συλλογής.

Στην περίπτωση δείγματος υετού ή υδάτων, αυτό διηθήθηκε σε αποστειρωμένη κωνική με αποστειρωμένο χαρτί για την απομάκρυνση ιζημάτων. Στη συνέχεια τα βακτήρια του δείγματος κατακρατήθηκαν με τη συσκευή διήθησης υπό κενό πολλαπλών θέσεων και τη χρήση φίλτρων ISOPORE MEMBRANE FILTERS των 0.4 μm HTBP. Τα φίλτρα στη συνέχεια εμβαπτήστικαν σε falcon των 15 ml με 10 ml 10mM ph buffer και ανατάραχτηκαν έντονα και με διάρκεια για να ξεσηκωθούν τα βακτήρια. Στη συνέχεια οι αραιώσεις, μέχρι τη  $10^{-4}$ , καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με TSA και KB+ και πραγματοποιήσαμε με τον ίδιο τρόπο που χρησιμοποιήσαμε στα στερεά δείγματα τεστ παγοπυρήνωσης.

#### 4.2. Βακτηριακά Στελέχη: απομόνωση και καλλιέργεια.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στη συλλογή παγοπυρηνωτικών βακτηρίων, του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και νέες απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της μελέτης αυτής οι οποίες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Όνομασία στελεχών	Προέλευση
X1 -X12	Πάρνηθα
X13 - X17	Παρνασσός
LSB	Λάρισα
K18 - 2	Κοπαΐδα
Cop	Κοπαΐδα
WL	Καλλιέργεια σιταριού στην Οινόη
GraPa	Πύργος ΟΤΕ στην Πάρνηθα

Πίνακας 1. Συλλογή βακτηρίων που απομονώθηκαν από περιβαλλοντικά δείγματα κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

Τα παραπάνω στελέχη καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν είτε Nutrient agar είτε King's B, θρεπτικά υποστρώματα των οποίων οι συνταγές βρίσκονται σε αντίστοιχο παράρτημα στο τέλος αυτής της μελέτης.

#### 4.3. Δοκιμή παγοπυρήνωσης των στελεχών της συλλογής.

Σε τρυβλία KB στα οποία είχε αναπτυχθεί ένα στέλεχος προστέθηκαν 2 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού και με ελαφριά ανατάραξη με αποστειρωμένη γυάλινη ράβδο που έχει κατάλληλο σχήμα μορφής Γ, παραλήφθηκε αιώρημα βακτηρίων σε φιαλίδιο Universal. Το αιώρημα συμπληρώθηκε με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 5 ml. Καθ'όλη τη διαδικασία τα φιαλίδια Universal βρίσκονταν βυθισμένα σε πάγο.

Από το φιαλίδιο Universal λήφθηκε 1 ml το οποίο και τοποθετήθηκε σε κυψελίδα, προστέθηκε 1 ml αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό και έγινε μέτρηση οπτικής πυκνότητας του αιωρήματος στα 600nm.

Από τα 4 ml που υπολείφθηκαν στα Universal λήφθηκαν 50 ml και σε νέο αποστειρωμένο Universal προστέθηκαν 450 ml αποστειρωμένου νερού για να γίνει η πρώτη δεκαδική αραιώση.

Στην επιφάνεια αποστειρωμένου αλουμινένιου δίσκου τοποθετήθηκαν 20 σταγόνες των 20 ml με χρήση πολυκάναλης πιπέτας από κάθε αιώρημα και την πρώτη αραιώσή του. Ο δίσκος προηγουμένως είχε καλυφθεί με ένα λεπτό φιλμ βαζελίνης για να αποφευχθεί ανεπιθύμητη μόλυνση από το δισκό, αλλά και για να δημιουργηθεί υδρόφοβο περιβάλλον ώστε οι σταγόνες να μην απλωθούν και κινδυνεύσουν να συγχωνευθούν.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκε ο δίσκος σε υδατόλουτρο και έγινε μέτρηση των σταγόνων που πάγωναν καθώς έπεφτε η θερμοκρασία του. Η μέτρηση έγινε ένα λεπτό μετά την πτώση της ένδειξης της θερμοκρασίας στον παρακάτω βαθμό και γινόταν από τους 0 έως τους  $-9^{\circ}\text{C}$ . Για κάθε αρχικό αιώρημα και την πρώτη αραιώσή του τοποθετήθηκαν 24 σταγόνες αντίστοιχα, στον αλουμινένιο δίσκο. Ως αρνητικός μάρτυρας της δοκιμής παγοπυρήνωσης χρησιμοποιήθηκαν 20 σταγόνες απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού.

Τα στελέχη όταν μεταφέρονταν από το στόκ στα θρεπτικά υποστρώματα έμεναν σε επωαστικό θάλαμο των  $28^{\circ}\text{C}$  για 48h σε φιαλίδιο με κλίση θρεπτικού υποστρώματος Nutrient agar και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε τρυβλία με King's B τα οποία έμεναν σε επωαστικό θάλαμο των  $22^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4. Δοκιμή οξειδάσης των στελεχών της συλλογής.

Από τα παραπάνω τρυβλία λαμβάνεται μια μικρή ποσότητα καλλιέργειας με τη χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου και απλώνεται σε διηθητικό χαρτί που προηγουμένως έχει διαβραχεί με μικρή ποσότητα υδατικού διαλύματος 1% *N,N,N',N' - tetramethyl - p - phenylenediamine*. Γίνεται παρατήρηση της καλλιέργειας για μερικά δευτερόλεπτα και αν σε αυτό το χρονικό διάστημα βαφτεί μπλέ καταγράφεται ως θετική στη δοκιμή. Αυτή η δοκιμή μας βοηθά να διαχωρίσουμε τα στελέχη στα είδη *syringae* και *fluorescence* του γένους *Pseudomonas*, με τα πρώτα να είναι αρνητικά στη δοκιμή.

#### 4.5. Αντίδραση υπερευαισθησίας των στελεχών της συλλογής σε φύλλα καπνού της ποικιλίας *Turkish*.

Σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria Broth αναπτύχθηκαν τα στελέχη της συλλογής, με 24ωρη ανάδευση στις 170 στροφές και τους 26°C.

Φυγοκεντρήθηκαν 2 ml της καλλιέργειας σε erpendorf για 5 λεπτά στις 4000 στροφές.

Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 ml H<sub>2</sub>O για ξέπλυμα.

Φυγοκεντρήθηκε όπως και προηγουμένως και απομακρύνθηκε και αυτό το υπερκείμενο.

Προστέθηκαν 2 ml MgCl<sub>2</sub> 10 mM και το ίζημα επαναιωρήθηκε.

Χρησιμοποιώντας 1 ml του τελικού διαλύματος μολύνθηκαν τα φύλλα φυτών καπνού και μετά από 18 ώρες έγινε η παρατήρηση της υπερευαισθησίας. Τα θετικά στελέχη είναι και φυτοπαθογόνα.

#### 4.6. Δοκιμή αντιορρών έναντι πρωτεΐνης INA για παρατήρηση βακτηρίων με ανοσοφθορισμό.

Η μέθοδος της ανίχνευσης με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιείται ευρέως για την επισήμανση της παρουσίας μικροοργανισμών ιατρικής ή φυτοπαθολογικής σημασίας. Έχουν κατασκευαστεί αντιορροί για την ανίχνευση μεγάλου αριθμού τέτοιων μικροοργανισμών. Αυτοί οι αντιορροί απομονώνονται από τον ορό του αίματος ζώων που έχουν εμβολιαστεί με έναν μικροοργανισμό. Παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ζώου ως αντίδραση της παρουσίας συγκεκριμένων αντιγόνων που βρίσκονται στην επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης του μικροοργανισμού, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες κ.λπ. Είναι λοιπόν αναγκαίο να δημιουργηθούν αντιορροί με εξειδίκευση σε ένα είδος αντιγόνου για την αποφυγή εσφαλμένης ανίχνευσης και λαθών στην μέτρηση. Θεωρητικά, θα έπρεπε να είναι εφικτή η εκλεκτική σήμανση και ανίχνευση παγοπυρηνωτικών βακτηρίων, χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα με εξειδίκευση στην παγοπυρηνωτική πρωτεΐνη. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής αντιορροί:

1. Fluffy 3 και APTPIS, προσφορά της Dr. Cindy Morris, Institut National de la Recherche Agronomique, Avignon, France. Οι αντιορροί αυτοί έχουν εξειδίκευση για τα βακτήρια *Pseudomonas syringae*.
2. Anti-inaZ, προσφορά του καθηγητή Δ. Κυριακίδη, Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Παν/μιο Θεσσαλονίκης (Palaiomylitou et al, Cryobiology, 1998).

Σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα KB+ επώαστηκαν βακτηριακά στελέχη για 48 ώρες στους 25 °C.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκε αραιό βακτηριακό αιώρημα με αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό. Από αυτό το αιώρημα τοποθετήθηκαν 30 μl στα πηγαδάκια αντικειμενοφόρων Biomerieux των 10 θέσεων και υπήρξε αναμονή έως ότου να ξηρανθεί πλήρως.

Με τη βοήθεια φυσιολογικού ορού παρασκευάστηκαν στη συνέχεια αραιά αιωρήματα των αντιορρών. Οι αραιώσεις που έγιναν αρχικά ήταν 1/100 και 1/1000 για το Anti-inaZ και 1/50 για τα άλλα τρία. Στην περίπτωση του Anti-lapin τα αιωρήματα έπρεπε να διατηρούνται στο σκοτάδι.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 50μl συγκεκριμένου αιωρήματος, των πρώτων τριών, σε κάθε θέση. Υπήρξε αναμονή 30 λεπτών και ξέπλυμα σε αποστειρωμένα σκαφάκια με φυσιολογικό ορό. Μετά το ξέπλυμα τοποθετήθηκε προσεκτικά απορροφητικό χαρτί για να επιτευχθεί πλήρης ξήρανση.

Σε κάθε θέση στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 50μl αιωρήματος του Anti-lapin.

Οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν στο σκοτάδι για 30 λεπτά και ακολούθησε νεό ξέπλυμα με φυσιολογικό ορό και προσεκτική τοποθέτηση απορροφητικού χαρτιού.

Σε αυτή τη φάση τοποθετήθηκε μια σταγόνα Vectashield Mounting medium for fluorescence H-1000 σε κάθε θέση και οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν για άλλα 15 λεπτά στο σκοτάδι. Αυτή η επίστρωση έγινε, αφ' ενός για να αποφευχθεί η φωτοχημική καταστροφή των φθοροφόρων κάτι γνωστό ως φωτοαποχρωματισμός και αφ' ετέρου για την δυνατότητα που δίνει για αποθήκευση των αντικειμενοφόρων για μεγάλο χρονικό διάστημα έτσι ώστε να γίνονται επιτυχείς παρατηρήσεις αρκετές εβδομάδες μετά την αρχική τοποθέτηση στην αντικειμενοφόρο αυτού του αντιδραστηρίου.

Μετά τα 15 λεπτά στο σκοτάδι έγινε παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss που διαθέτει το εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας.

Σε πρώτη φάση σε αυτό το πείραμα, χρησιμοποιήθηκε ως μέσο παρατήρησης το φίλτρο ISOPORE στο οποίο προσηλώνονταν τα βακτήρια μετά το στέγνωμα του βακτηριακού αιωρήματος με cross-linking.

Κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος δοκιμάστηκαν διάφοροι χρόνοι ξεπλύματος. Η αρχική αραίωση που χρησιμοποιήθηκε για τα αντισώματα Fluffy 3 και APTPIS, αυτή των 1/50, αντικαταστάθηκαν από τις 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000 και 1/10000 στην προσπάθειά μας να αντιμετωπίσουμε προβλήματα ανεπαρκούς εξειδίκευσης αυτών των αντισωμάτων.

#### 4.7. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη.

Το DNA των στελεχών της συλλογής που έδειξαν παγοπυρηνωτική δραστηριότητα και στη συνέχεια αυτών που απομονώθηκαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα, απομονώθηκε με τη βοήθεια του Κίτ της SIGMA, GenElute<sup>Tm</sup> Bacterial Genomic DNA Kit. Αυτό το DNA χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της PCR για τη δημιουργία ενός επιπρόσθετου τρόπου ταυτοποίησης της παγοπυρηνωτικής ικανότητας άγνωστων βακτηριακών στελεχών.

#### 4.8. Ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών διαφόρων γονιδίων *Ina*.

Με τη χρήση της PCR, στα στελέχη της συλλογής, σε πρώτη φάση, και στη συνέχεια στέλεχη που απομονώθηκαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα και έδειξαν παγοπυρηνωτική δραστηριότητα, λήφθηκε προϊόν που επιβεβαίωσε αυτή τη δραστηριότητα.

Τα αντιδραστήρια για την PCR είναι τα παρακάτω:

Template DNA	5 $\mu$ l
5x Buffer	10 $\mu$ l
50 mM MgCl	3 $\mu$ l
dNTPs	1 $\mu$ l
Primers	1+1 $\mu$ l
Go taq Polymerase	0.25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	28.75 $\mu$ l

Τα ζεύγη των Primers που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Sense-Z:

5'- GAGAATGGTCTGGTCGGTTTACTGTGG - 3' (θέση 921 - 948 του 5'-άκρου του *inaZ* γονιδίου),

Antisense-Z:

5'- TCAACACCGTTCTCACCCGTTCTGG - 3' (θέση 4290 - 4315 του 3'- άκρου του *inaZ* γονιδίου), (Dimos et al. 2006).

Sense-A:

5'- ATGAGTGTATCGCTATTGAAACTCATGG - 3' (θέση 961 - 989 του 5'- άκρου του *inaA* γονιδίου),

Antisense-A:

5'- ACGATATTATTGTCCTCATCCATCTGG - 3' (θέση 4933 - 4960 του 3'- άκρου του *inaA* γονιδίου), Dimos et al. 2006).

Sense-W1:

5' - GCGGTCTGGTATGGCCTATTT - 3' (θέση 59 - 79 του 5'- άκρου του *inaW* γονιδίου),

Antisense- W1:

5' - CCGGCGTATCGCTATTGTCC- 3' (θέση 3588 - 3607 του 3'- άκρου του inaW γονιδίου), (Castrillo et al. 2000).

Sense-W2:

5' - AACCAGATTGCGAGTCATAAG - 3' (θέση 3052 - 3072 του 5'- άκρου του inaW γονιδίου),

Antisense- W2:

5' - CATGGCTGAATCTGAGACTGG - 3' (θέση 3612 - 3632 του 3'- άκρου του inaW γονιδίου), (Ahern et al, 2007).

Τα πρωτόκολλα της PCR που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

1. (Dimou et al. 2006, 157)

Denaturation step	94°C, 4 min
Amplification step	30 cycles
Denaturation	94°C, 1 min
Reannealing	58°C, 2 min
Polymerization	72°C, 5 min
Elongation step	72°C, 10 min

2. Touch Up από τους 50°C

1. 94 for 5 min
2. 94 for 45 sec
3. 50 for 45 sec
4. +0,5 per cycle
5. 72 for 1,5 min
6. GOTO 2 20 times
7. 94 for 45 sec
8. 60 for 45 sec
9. 72 for 1,5 min



10. GOTO 6 20 times

11. 72 for 5 min

3. Touch Down από τους 60 °C

1. 94 for 3 min

2. 94 for 45 sec

3. 60 for 45 sec

4. -0,5 per cycle

5. 72 for 45 sec

6. GOTO 2 19 times

7. 94 for 45 sec

8. 50 for 45 sec

9. 72 for 45 sec

10. GOTO 6 20 times

11. 72 for 3 min

Χρησιμοποιώντας τις θέσεις των primers και τις αλληλουχίες των Ina γονιδίων από τη Βάση Δεδομένων GenBank μπορέσαμε να υπολογίσουμε τα έγκυρα προϊόντα που θα έπρεπε να λάβουμε.

Μέγεθος Αναμενόμενων προϊόντων:

inaA	→	3729 bp
inaZ	→	3394 bp
inaW(W1)	→	3548 bp
inaW(W2)	→	580 bp

#### 4.9. Απομόνωση ολικού DNA από περιβαλλοντικό δείγμα για ανίχνευση γονιδίων *Ina*.

Χρησιμοποιήσαμε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης DNA (Robert S. Burlage et al. 1998), από επιφανειακά εδάφη και κομπόστες μικρής περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και το προσαρμόσαμε με πολύ μικρές αλλαγές για δείγματα χαμηλής βιομάζας όπως είναι το χιόνι.

Υλικά και αντιδραστήρια.

1. Αποστειρωμένα πολυανθρακικά σωληνάρια Oak Ridge των 30 ml.
2. Washing Buffer (120 mM sodium phosphate, pH 8): 0.88 gr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 16.13 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  και το φαιρνούμε σε όγκο ενός λίτρου προσθέτοντας νερό. Το pH του συνακόλουθου Buffer θα πρέπει να είναι 8.
3. Πρόσβαση σε καταψύκτη των  $-80^\circ\text{C}$ .
4. Lysis Solution I: 150 mM NaCl, 100 mM EDTA (pH 8), 10 mg/ml Lysozyme.  
Lysis Solution II: 100 mM NaCl, 500 mM Tris HCl (pH 8), 10% SDS.
5. 5 M NaCl
6. 10% CTAB σε 0.7 M NaCl
7. 13% Polyethylene glycol (8000 MB) σε 1.6 M NaCl
8.  $\text{CHCl}_3$ : Ισοαμυλική αλκοόλη (24:1)
9. 10 M Ammonium acetate
10. 70% Αιθανόλη
11. 95% Αιθανόλη
12. TE Buffer: 10 mM Tris HCl, 1mM EDTA (pH 8)
13. Αποστειρωμένα eppendorfs των 1.5 ml

Διαδικασία.

Αρχικά ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε στην απομόνωση βακτηριακών αποικιών από περιβαλλοντικά δείγματα υετού ή υδάτων.

### Απομάκρυνση εξωκυτταρικού DNA.

Προστέθηκαν 10 ml Washing Buffer σε σωληνάριο Oak Ridge των 30 ml που περιείχε το φίλτρο ISOPORE και στη συνέχεια στροβιλίστηκαν για 1 λεπτό και αφέθηκαν σε ηρεμία για 10 λεπτά με περιστασιακή ανάμειξη. Φυγοκεντρίθηκε στις 8000 Rpm (7500 x g) για 10 λεπτά και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο.

### Διάλυση του DNA.

Προστέθηκαν 8 ml του Lysis Solution I στο σωληνάριο και έγινε ανάμειξη. Επώαστηκε στους 37°C με περιστασιακή ανάμειξη για 1 -2 ώρες. Μετά από αυτό το χρόνο προστέθηκαν 8 ml του Lysis Solution II και πραγματοποιήθηκαν τρεις κύκλοι ψύξης στους -70°C για 20 λεπτά και θέρμανσης στους 65°C για 20 λεπτά. Τέλος, έγινε φυγοκέντριση στις 8000 Rpm (7500 x g) για 10 λεπτά και απομακρύνθηκε το ίζημα.

### Καθαρισμός του DNA.

Στο υπερκείμενο που απέμεινε, από την παραπάνω διαδικασία, προστέθηκαν 2.7 ml του 5 M NaCl, 2.1 ml του 10% CTAB σε 0.7 M NaCl. Αναμείχθηκαν και επώαστηκαν στους 65°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος CHCl<sub>3</sub>: Ισοαμυλικής αλκοόλης και αναμείχθηκαν με ήπια αντιστροφή του σωληναρίου. Φυγοκεντρίθηκαν στις 5000 Rpm (3000 x g) και η άνω φάση μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο. Η κάτω φάση απορρίφθηκε. Προστέθηκε ίσος όγκος 13% Polyethylene glycol (8000 MB) σε 1.6 M NaCl στην άνω φάση και αναμείχθηκαν. Το μείγμα διατηρήθηκε σε πάγο για 10 λεπτά. Φυγοκεντρίθηκε στις 10000 Rpm (12000 x g) για 15 λεπτά και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Το ίζημα πλύθηκε με 70% Αιθανόλης. Το ίζημα στεγνώθηκε και τα νουκλεϊκά οξέα διαλύθηκαν σε 750 μl TE και μεταφέρθηκε σε erpendorf των 1.5 ml, όπου προστέθηκαν 110 μl 10 M Ammonium acetate και το μείγμα διατηρήθηκε σε πάγο για 10 λεπτά. Αμέσως μετά φυγοκεντρίθηκε στις 10000 Rpm (12000 x g) για 15 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf. Το ίζημα απορρίφθηκε. Προστέθηκαν 2 όγκους Αιθανόλη. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 10000 Rpm (12000 x g) για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα πλύθηκε με 70% Αιθανόλη. Αφέθηκε να

στεγνώσει και διαλύθηκε σε 200 μl TE. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε 0.8% αγαρόζη που περιείχε 2% PVP, η μάντα από το τζελ κόπηκε, προστέθηκε ίσος όγκος νερού και έλυσε στους 65°C.

Σε αυτό το εκχύλισμα DNA εξετάστηκε με PCR η ύπαρξη γονιδίων παγοπυρήνωσης, σύμφωνα με την παράγραφο 4.8.

Αριθμός δείγματος	Προέλευση	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ
1	Πάρνηθα, περιοχή πληγείσα από πυρκαγιά	13/3/2008
2	Πάρνηθα, περιοχή γύρω από τον πύργο του ΟΤΕ	13/3/2008
3	Πάρνηθα, περιοχή πληγείσα από πυρκαγιά	13/3/2008
4	Πάρνηθα, περιοχή γύρω από το γήπεδο	20/3/2008
5	Πάρνηθα, περιοχή γύρω από το γήπεδο	20/3/2008
6	Πάρνηθα, περιοχή γύρω από το γήπεδο	20/3/2008
7	Πάρνηθα, περιοχή γύρω από τον πύργο του ΟΤΕ	20/3/2008
8	Πάρνηθα, περιοχή γύρω από τον πύργο του ΟΤΕ	25/3/2008
9	Πάρνηθα, περιοχή γύρω από το γήπεδο	25/3/2008
10	Πάρνηθα, περιοχή γύρω από το γήπεδο	25/3/2008

Πίνακας 2. Συλλογή δειγμάτων στα οποία εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 4.9 αυτού του κεφαλαίου.

### 13/3/2008 Ανάλυση 3 πρώτων δειγμάτων χιονιού από την Πάρνηθα.

Αριθμός Δείγματος	Τοποθεσία και ημερομηνία	Αρχικός όγκος δείγματος	Διαίρεση αρχικού όγκου
1	Ανάμεσα σε καμένα δέντρα από τις 21/2	433ml	205/228
2	Από τον Πύργο του ΟΤΕ από τις 3/2	394ml	211/183
3	Ανάμεσα σε καμένα από τις 3/2	295ml	150/145

Το πρώτο μέρος του αρχικού όγκου χρησιμοποιήθηκε στο πρωτόκολλο απομόνωσης περιβαλλοντικού DNA και το δεύτερο στρώθηκε σε τρυβλία TSA και KB+.

Στο τρίτο δείγμα, στο τρίτο βήμα της διαδικασίας απομάκρυνσης εξωκυτταρικού DNA από το πρωτόκολλο δεν αφαιρέθηκε το υπερκείμενο όπως υποδεικνύει το πρωτόκολλο.

Αφού προστέθηκαν τα αντιδραστήρια του πρώτου βήματος της διαδικασίας καθαρισμού, αναμείχθηκαν και αφέθηκαν να επωαστούν, ο συνολικός όγκος τους μειώθηκε στα 14ml για να συμπληρωθεί με ίσο όγκο μείγμα χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης.

20/3/2008 Ανάλυση 5 δειγμάτων χιονιού από την Πάρνηθα.

Αριθμός Δείγματος	Τοποθεσία και ημερομηνία	Αρχικός όγκος δείγματος
4	Από το γήπεδο από τις 3/2	615ml
5	Από το γήπεδο από τις 3/2	540ml
6	Από το γήπεδο από τις 3/2	311ml
7	Από τον Πύργο από τις 3/2	304ml
8	Από τον Πύργο από τις 3/2	512ml

Στα δείγματα 1<sub>1</sub> και 2<sub>2</sub> δε χρησιμοποιήθηκε Washing Buffer αλλά Ph Buffer για την ελευθέρωση των βακτηρίων από τα φίλτρα. Έγινε φυγοκέντριση με το φίλτρο μέσα στα tubes. Μετά από μία ώρα σε bath των 37°C με Lysis Solution I και χωρίς την προσθήκη λυσοζύμης τοποθετήθηκαν όλα τα δείγματα στους 4°C overnight. Την επόμενη προστέθηκε η λυσοζύμη και το μείγμα έμεινε για μία ώρα σε bath των 37°C.

25/3/2008 Ανάλυση των 2 τελευταίων δειγμάτων από την Πάρνηθα.

Αριθμός Δείγματος	Τοποθεσία και ημερομηνία	Αρχικός όγκος δείγματος	Διαίρεση αρχικού όγκου
9	Από το γήπεδο από τις 21/2	416ml	216/200
10	Από το γήπεδο από τις 3/2	382ml	182/200

Το πρώτο μέρος του αρχικού όγκου χρησιμοποιήθηκε στο πρωτόκολλο απομόνωσης περιβαλλοντικού DNA και το δεύτερο στρώθηκε σε τρυβλία TSA και KB+.

Στο δεύτερο βήμα του καθαρισμού δεν πλύθηκε κανένα δείγμα με 70% αιθανόλη, αλλά τοποθετήθηκαν 500μl αιθανόλης και έγινε φυγοκέντριση στις 10000rpm για 5min, με σκοπό να αγνοηθεί το τρίτο βήμα του καθαρισμού φοβούμενοι την απώλεια που ενδέχεται να υπάρξει σε ποσότητα DNA.

### *5.1. Καταμέτρηση πληθυσμών ολικών και παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε περιβαλλοντικά δείγματα από διαφορετικά ενδιαιτήματα.*

Αρχικά αυτή η μελέτη έγινε χρησιμοποιώντας φύλλα Ελιάς και εσπεριδοειδών (Λεμονιά, Μανταρινιά, Πορτοκαλιά και Φράπα) που βρίσκονται στο δενδροκομείο του Γ.Π.Α.

Συμπληρωματικά συλλέχθηκαν φύλλα Ελιάς από τον αερολιμένα του Τατοΐου.

Στη συνέχεια από την περιοχή της Οινόης πήραμε φύλλα σιταριού, δείγματα από τη ριζόσφαιρα της παραπάνω καλλιέργειας και χώμα από ακαλλιέργητο χωράφι, δίπλα στο χωράφι της καλλιέργειας.

Χώμα συλλέχθηκε και από την περιοχή της Πάρνηθας. Συγκεκριμένα από τον Πύργο του ΟΤΕ καθώς και από το γήπεδο που βρίσκεται πλησίον του εγκαταλελειμένου ξενοδοχείου Ξενία.

Τα επόμενα δείγματα αφορούν στα δείγματα χιονιού και νερού.

Νερό συλλέχθηκε από ποτάμι και λίμνη της περιοχής των Γρεβενών

Χιόνι συλλέχθηκε από το Βέρμιο, τα Γρεβενά, το Καρπενήσι και την Πάρνηθα.

Μετά τα αποτελέσματα των μετρήσεων κάθε ομάδας δειγμάτων, ακολουθεί πίνακας όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δοκιμών οξειδάσης, της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του αιωρήματος της πρώτης δεκαδικής αραιώσης και της ικανότητας παγοπυρήνωσης των στελεχών που έδωσαν φθορισμό στα τρυβλία με το KB+.

Στο παράρτημα II βρίσκονται συγκεντρωμένα τα πληθυσμιακά ποσοστά όλων των περιβαλλοντικών δειγμάτων που αναλύθηκαν σε αυτή την εργασία.

### *5.2. Βιοχημικές δοκιμές βακτηριακών στελεχών της συλλογής.*

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής οξειδάσης, της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του αιωρήματος της πρώτης δεκαδικής αραιώσης, της θερμοκρασίας στην οποία παρατηρείται η πρώτη αντίδραση παγοπυρήνωσης από αιώρημα μηδενικής αραιώσης και της αντίδρασης υπερευαισθησίας φύλλων καπνού της ποικιλίας Turkish στα βακτηριακά στελέχη της συλλογής. Αναλυτικά δεδομένα των δοκιμών παγοπυρήνωσης παρουσιάζονται στον πίνακα του παραρτήματος I.

Βακτηριακό στέλεχος	Δοκιμή Οξειδάσης	O.D.	Αρχική T	Δοκιμή Υπερευαισθησίας
P. syringae 31R1	-	1.456	-7	+
E. coli pT3T7 inaZ	-	1.456	-7	-
E. coli PCIBRI	-	0.649	-6	+
P. syringae cit 7	-	1.455	-3	+
E.herbicola 268Rb-2	-	1.405	-4	+
kehrv FR01	-	2.399	-6	+
antarc 02RA	+	1.652	-5	-
cop5	+	1.456	-5	+
cop4	+	1.647	-5	+
cop3	+	2.347	<-9	+
cop2	+	1.208	-6	+
cop1	+	2.352	-7	+
FMn 107	-	1.653	-4	+
5BFPF 12	-	2.378	<-9	+
Mti 13	-	2.183	-4	+
K18-2	+	2.237	-7	+
B728a	-	2.278	-6	+
FR1	-	1.669	-5	+
FR2	-	2.672	-6	+
MT13	-	1.58	-5	+
MT42	-	1.37	-5	+
BPIC 1439	-	2.182	-6	+
BPIC 1440	-	0.623	-5	+
LSB1	+	1.576	<-9	+
LSB2	+	1.607	<-9	+
LSB4	+	2.371	-9	+
LSB6	-	2.477	-8	+
LSB8	+	1.895	<-9	+
LSB10	+	2.014	<-9	+
LSB12	+	2.451	-8	+
LSB14	+	1.865	<-9	+
LSB22	+	1.026	<-9	+
LSB23	+	1.29	<-9	+
LSB24	+	2.256	-9	+
CC40	-	1.111	-6	+
CC44	-	1.86	-4	+
CC94	+	2.491	-5	+
CC234	-	2.362	-5	+



Πίνακας 3. Χαρακτηρισμός βακτηριακών στελεχών της συλλογής ως προς την αντίδραση στην οξειδάση, την αρχική θερμοκρασία παγοπυρήνωσης και την δοκιμή υπερευαισθησίας.

Βακτηριακό στέλεχος	Δοκιμή Οξειδάσης	O.D.	Αρχική T	Δοκιμή Υπερευαισθησίας
X1	+	1.455	-6	+
X2	+	1.561	-7	+
X3	+	1.115	-5	+
X4	+	0.936	-5	+
X5	+	1.443	-6	+
X6	+	2.006	-7	+
X7	+	1.385	-6	+
X8	+	1.814	-6	+
X9	+	2.151	-7	+
X10	+	1.455	-7	+
X11	+	1.016	-5	+
X12	+	2.239	-7	+
X13	+	1.456	-8	+
X14	+	1.456	-8	+
X15	+	1.372	<-9	+
X16	+	1.525	-7	+
X17	+	1.001	-6	+
WL1	-	0.096	-5	+
WL2	-	0.103	-6	+
WL3	-	0.112	-5	+
WL4	-	0.102	-5	+
WL5	-	0.095	-6	+
WL6	-	0.098	-5	+
WL7	-	0.344	-5	+
WL8	-	0.128	-7	+
WL9	-	0.135	-7	+
WL10	-	0.11	-5	+
WL11	-	0.084	-6	+
WL12	-	0.092	-5	+
WL13	-	0.082	-5	+
WL14	-	0.082	-5	+
WL15	-	0.087	-6	+
WL16	-	0.079	-6	+
WL17	-	0.086	-6	+
WL18	-	0.082	-5	+
GraPa8	+	0.189	-5	+

Πίνακας 4. Χαρακτηρισμός των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης ως προς την αντίδραση στην οξειδάση, την αρχική θερμοκρασία παγοπυρήνωσης και την δοκιμή υπερευαισθησίας.

### 5.3. Δοκιμή αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης INA για παρατήρηση βακτηρίων με ανοσοφθορισμό.

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων πολλά από τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε με το ένα ή με τον άλλο αντιορρό έδωσαν φθορισμό. Δυστυχώς όμως όλοι ανεξαιρέτως οι αρνητικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν θετικοί, ακόμα και στις μεγάλες αραιώσεις των αντιορρών.

Χαρακτηριστική φωτογραφία από αυτά τα πειράματα παρουσιάζεται στην εικόνα 7.

Δε λάβαμε ποτέ σκοτεινό πεδίο με τους αρνητικούς μάρτυρες.

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές των αντιορρών είναι τα παρακάτω:

X5  
Cit 7  
DH5α  
PCIBRI  
X14  
Cop 5  
FR1  
FR2  
Cc444  
Cc94

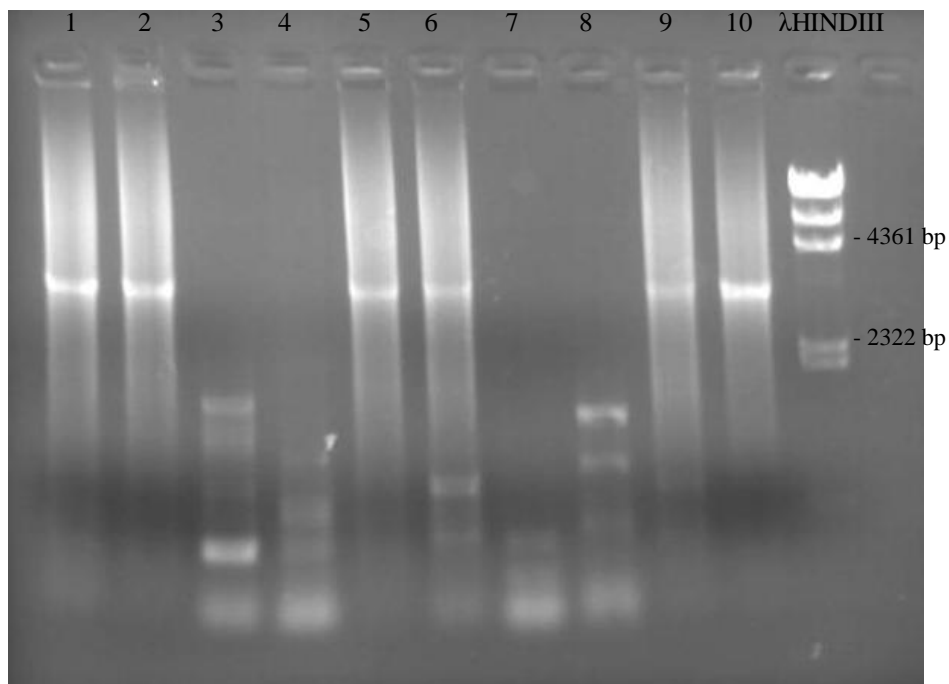


Εικόνα 7. Χαρακτηριστική φωτογραφία δοκιμής αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης INA για παρατήρηση βακτηρίων με ανοσοφθορισμό.

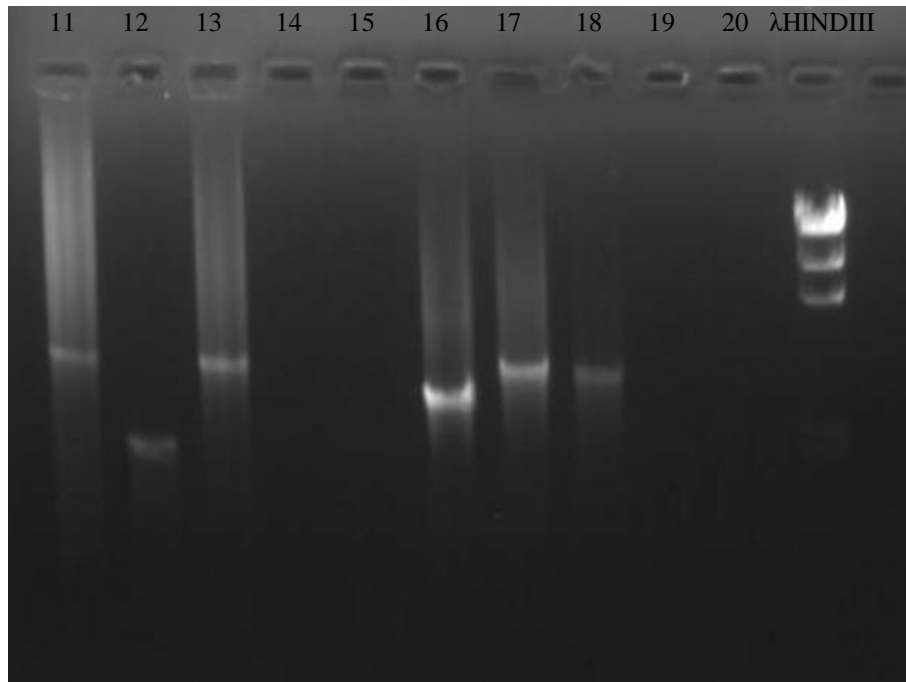
Τα βακτηριακά στέλεχη που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες ήταν τα στελέχη του *Pseudomonas fluorescens* X και *Pseudomonas aureofaciens* 41B6.

#### 5.4 Ενίσχυση με PCR των αλληλουχιών των διαφόρων γονιδίων *Ina*.

Έγινε μια σειρά από αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιώντας διαφορετικά πρωτόκολλα και διαφορετικά στελέχη, προκειμένου να βρεθούν κατάλληλοι συνδιασμοί, οι οποίοι στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν σε περιβαλλοντικά δείγματα



Εικόνα 8. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου Touch Down από τους 60°C στα στελέχη της συλλογής που ήταν αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaZ*.



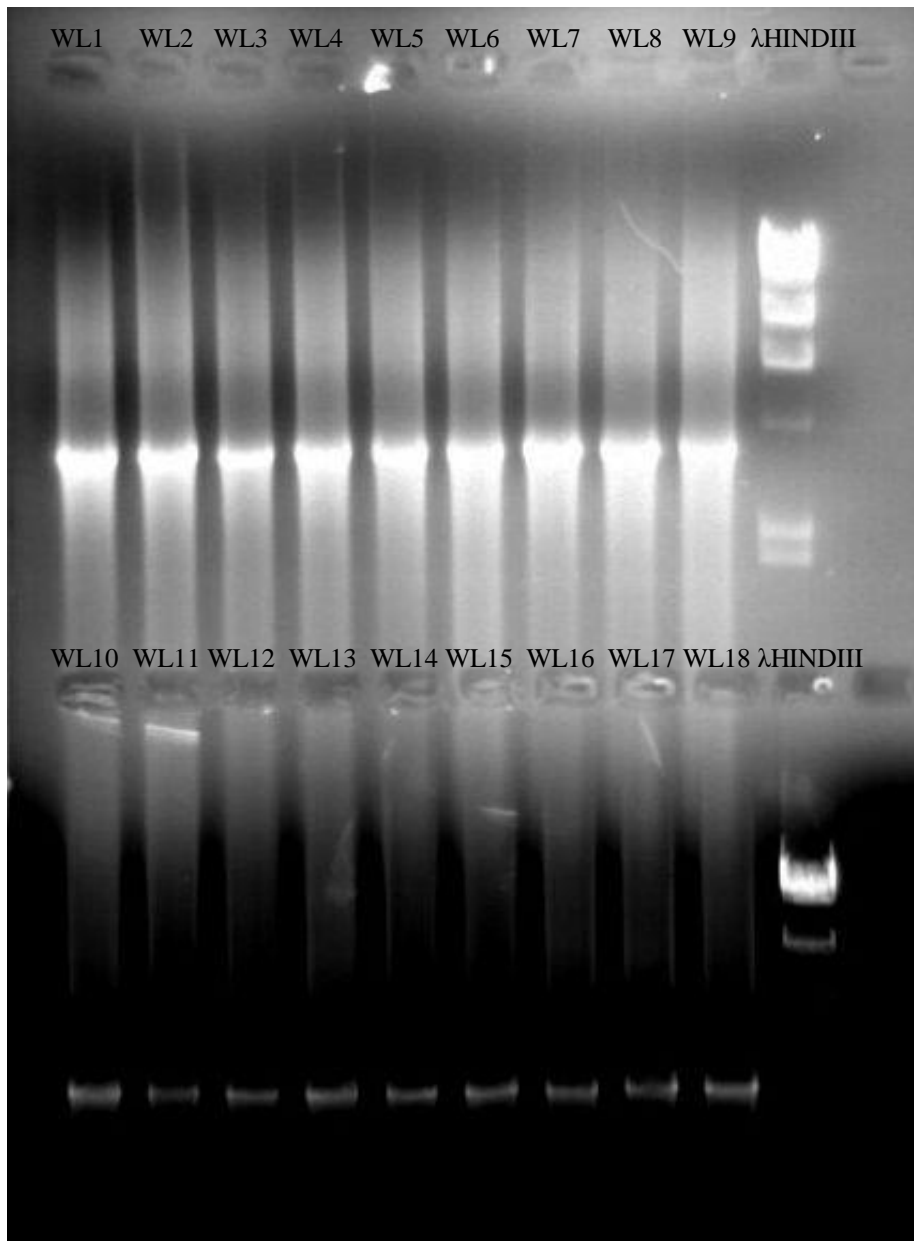
Εικόνα 9. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου Touch Down από τους 60°C στα στελέχη της συλλογής που ήταν αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaZ*.

Το πρωτοκόλλο Touch Down από τους 60°C εφαρμόστηκε στα στελέχη της συλλογής που ήταν αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που περιγράφονται στο προηγούμενο κεφάλαιο για το γονίδιο *inaZ*.

Σύμφωνα με τις εικόνες 8 και 9, στα στελέχη 1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 16, 17 και 18 παρατηρήθηκε μια μπάντα που αντιστηχούσε στις 3394 bp. Αυτό ήταν και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος που θα λαμβάναμε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του *inaZ*. Η εικόνα 10 δείχνει το προϊόν που λάβαμε από τα στελέχη που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης και ήταν αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης. Παρακάτω παρατίθεται κατάλογος με τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω αντιδράσεις.

#### Κατάλογος στελεχών

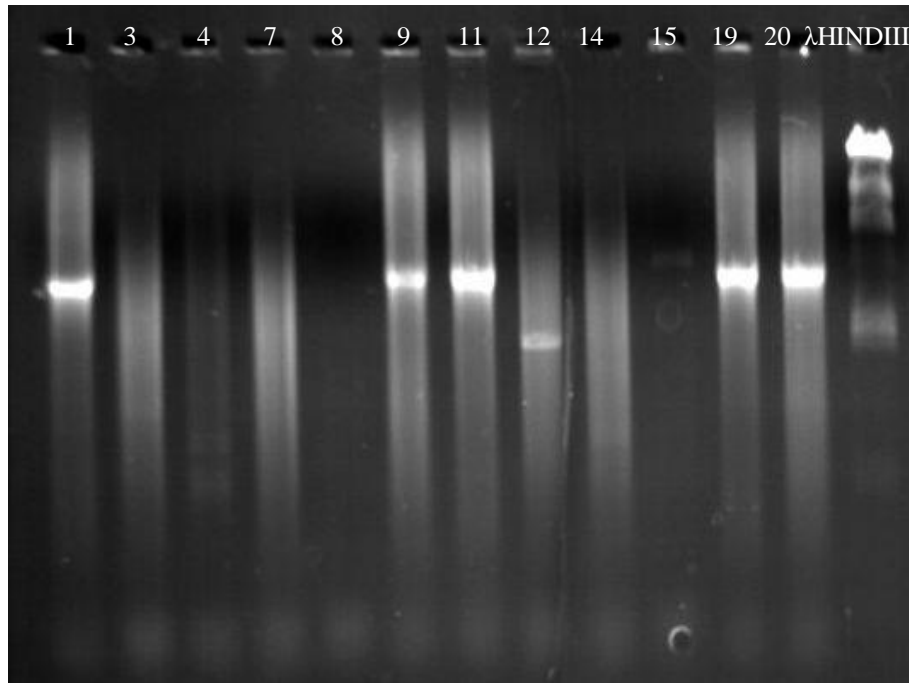
1. FR1	11. <i>P. syringae</i> cit 7
2. FR2	12. FMn 107
3. 5 BFPF 12	13. B728a
4. LSB 6	14. <i>E. herbicola</i> 268Rb-2
5. CC234	15. <i>E. coli</i> PT3T7
6. MT 13	16. CC40
7. BPIC 1440	17. MT 42
8. <i>E. coli</i> PCIBRI	18. BPIC 1439
9. MTi 13	19. <i>P. syringae</i> 31R1
10. Kehrv FR01	20. CC44



Εικόνα 10. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου Touch Down από τους 60°C στα στελέχη που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης και ήταν αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο των Dimou et al., (157) στα στελέχη που δεν έδωσαν αποτέλεσμα με το πρωτόκολλο Touch Down από τους 60°C και σε κάποια που έδωσαν για να παίξουν το ρόλο του θετικού μάρτυρα. Σύμφωνα με τη εικόνα 11 και τον κατάλογο των στελεχών που τη συνοδεύει, ως θετικοί μάρτυρες λόγω της απόδοσης προϊόντος με το προηγούμενο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη 1, 9 και 19.

Με αυτό το πρωτόκολλο έδωσαν προϊόν δύο στελέχη, το 11 και το 20, που με το προηγούμενο πρωτόκολλο στην περίπτωση του στελέχους 20 έδωσε μικρότερο προϊόν και στην περίπτωση του 11 καθόλου.



Εικόνα 11. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου των Dimou et al., (157) στα στελέχη που δεν έδωσαν αποτέλεσμα και σε κάποια που έδωσαν για να παίξουν το ρόλο του θετικού μάρτυρα.

Κατάλογος στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν με το πρωτόκολλο των Dimou et al.

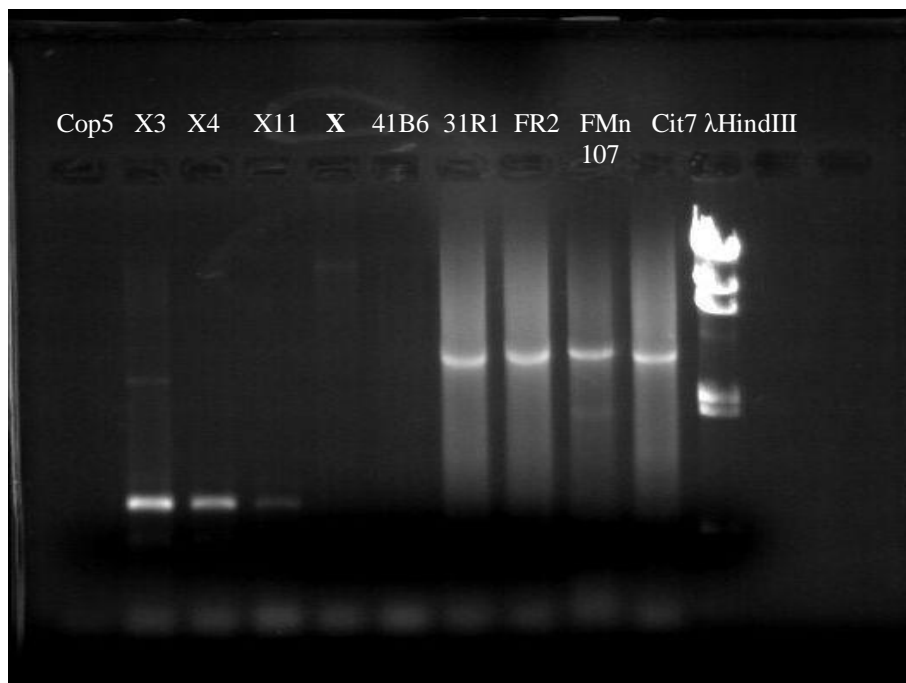
1 FR1	11 <i>P. syringae</i> 31R1
3 5 BFPF 12	12 CC44
4 LSB 6	14 <i>E. herbicola</i> 268Rb-2
7 BPK 1440	15 <i>E. coli</i> PT3T7
8 <i>E. coli</i> PCIBRI	19 <i>P. syringae</i> cit 7
9 MTi 13	20 FMn 107

Το επόμενο βήμα σε αυτή τη σειρά πειραμάτων ήταν η σάρωση κάποιων στελεχών, τόσο αρνητικών όσο και θετικών στη δοκιμή οξειδάσης, με ένα ζεύγος εκκινητών για την αξιολόγηση αυτών των εκκινητών. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που περιγράφονται στο προηγούμενο κεφάλαιο για τα γονίδια *inaZ*, *inaA*, *inaW1*, *inaW2*.

Με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaZ* έγιναν οι παρακάτω δοκιμές:

1. Touch Down από τους 60°C χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 12, δεξιά του 41B6 είναι στελέχη αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και αριστερά του X θετικά. Με μόνη εξαίρεση την περίπτωση του στελέχους X3, προϊόν έδωσαν όλα τα στελέχη που ήταν αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και κανένα από τα στελέχη που ήταν θετικά σε αυτή τη δοκιμή.



Εικόνα 12. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου Touch Down από τους 60°C με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaZ*, χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

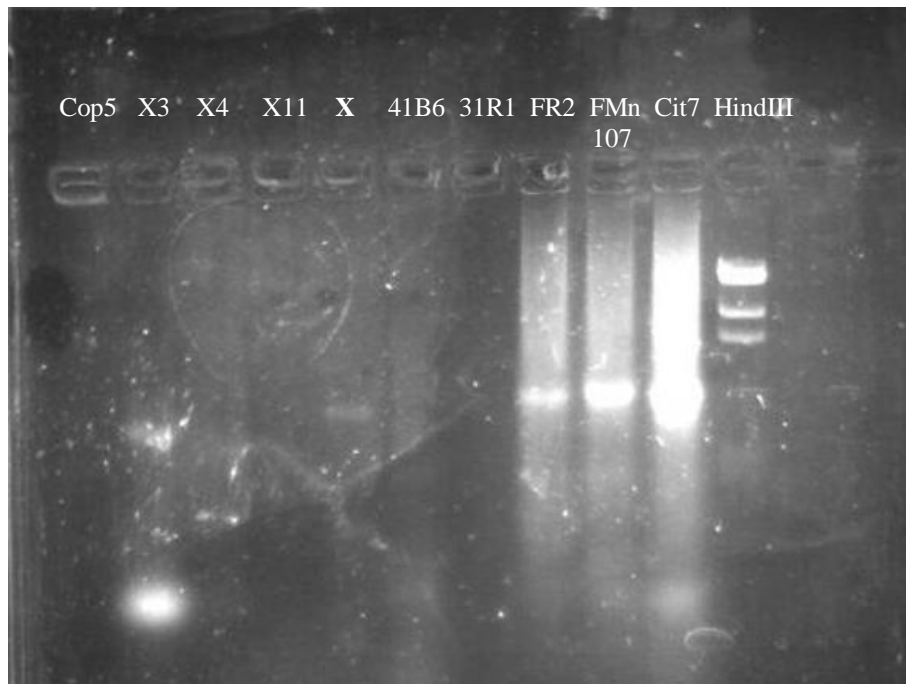
2. Touch Up από τους 50°C χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

Χρησιμοποιώντας τα ίδια βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν και στην προηγούμενη προσπάθεια, με μόνη εξαίρεση την περίπτωση του στελέχους X3, προϊόν έδωσαν όλα τα στελέχη που ήταν αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και

κανένα από τα στελέχη που ήταν θετικά σε αυτή τη δοκιμή. Αυτή τη φορά όμως το προϊόν που λήφθηκε από το FR2 ήταν ασθενές.

3. Dimou et al., (157) χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 13, δεξιά του 41B6 είναι στελέχη αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και αριστερά του X θετικά. Για άλλη μια φορά με μόνη εξαίρεση την περίπτωση του στελέχους X3, αν και δυσδιάκριτη, προϊόν έδωσαν όλα τα στελέχη που ήταν αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και κανένα από τα στελέχη που ήταν θετικά σε αυτή τη δοκιμή. Αυτή τη φορά όμως το στέλεχος 31R1 δεν έδωσε προϊόν.



Εικόνα 13. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου Dimou et al. (157) με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaZ*, χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

Με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaZ* και το κατάλληλο πρωτόκολλο καταφέραμε να λάβουμε προϊόν από στελέχη βακτηρίων που είναι αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης.



Με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaA* έγιναν οι παρακάτω δοκιμές:

1. Touch Up από τους 50°C χρησιμοποιώντας το X και το *Vibrio fischeri* ως αρνητικούς μάρτυρες.
2. Touch Up από τους 55°C χρησιμοποιώντας το X και το *Vibrio fischeri* ως αρνητικούς μάρτυρες.
3. Dimou et al., (177) χρησιμοποιώντας το X και το *Vibrio fischeri* ως αρνητικούς μάρτυρες.
4. Touch Down από τους 60°C χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

Σε αυτές τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στελέχη:

Cop5, X3, X4, X11, X, Vib, 31R1, FR2, FMn 107 και το Cit7, με τα στελέχη δεξιά του *Vibrio fischeri* αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και αριστερά του X θετικά.

Συνολικά αυτές οι δοκιμές ήταν ανεπιτυχείς. Σε καμία από αυτές δε λάβαμε ευδιάκριτα το αναμενόμενο προϊόν. Στην τρίτη δοκιμή αυτής της σειράς, μια σκιά στο πηγαδάκι του 31R1 ίσως να έχρηζε μιας δεύτερης δοκιμής.

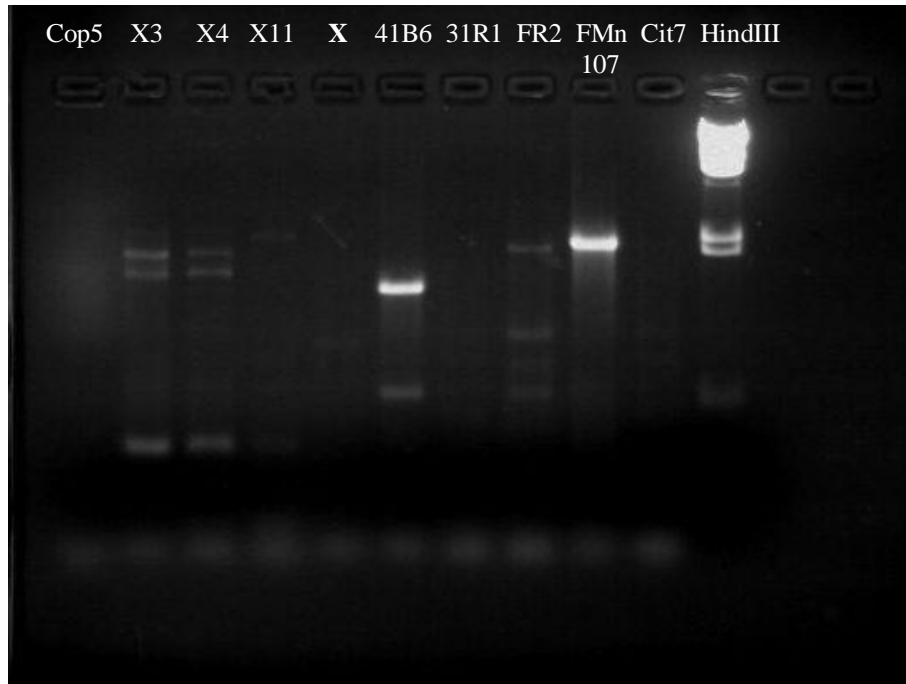
Με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaW1* έγιναν οι παρακάτω δοκιμές:

1. Touch Down από τους 60°C χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

Σε αυτή τη δοκιμή κανένα στέλεχος δεν έδωσε προϊόν.

2. Touch Down από τους 55°C χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 14, δεξιά του 41B6 είναι στελέχη αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και αριστερά του X θετικά. Σε αυτή τη δοκιμή κάποια από τα στελέχη που είναι αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης έδωσαν προϊόντα διαφόρων μεγεθών, μικρότερα όμως από το αναμενόμενο που είναι 3548 bp.



Εικόνα 14. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου Touch Down από τους 55°C, με τους εκκινητές για το γονίδιο inaW1 χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

3. Dimou et al., (177) με το βήμα επανασύνδεσης στους 47°C χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.
4. Touch Up από τους 50°C χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.
5. Dimou et al., (177) χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

Στην τρίτη και τέταρτη δοκιμή λάβαμε εικόνα πολλαπλών προϊόντων σε όλα τα στελέχη, όλα όμως μικρότερα των 3548 bp που αναμέναμε, ενώ στην πέμπτη δεν λάβαμε προϊόν.

Συνολικά μπορούμε να πούμε ότι οι δοκιμές που έγιναν με τους εκκινητές για το inaW1 σε καμία περίπτωση δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaW2* έγιναν οι παρακάτω δοκιμές:

1. Touch Down από τους 60°C χρησιμοποιώντας το X και το 41B6 ως αρνητικούς μάρτυρες.

Σε αυτή τη δοκιμή κανένα στέλεχος δεν έδωσε προϊόν.

2. Touch Up από τους 50°C χρησιμοποιώντας το X και το *Vibrio fischeri* ως αρνητικούς μάρτυρες.
3. Touch Up από τους 55°C χρησιμοποιώντας το X και το *Vibrio fischeri* ως αρνητικούς μάρτυρες.

Σε αυτές τις περιπτώσεις το αναμενόμενο προϊόν θα έπρεπε να έχει μέγεθος 580 bp και από τις φωτογραφία που πήραμε, δεν μπορέσαμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα.

4. Dimou et al., (157) χρησιμοποιώντας το X και το *Vibrio fischeri* ως αρνητικούς μάρτυρες.

Σε αυτή τη δοκιμή κανένα στέλεχος δεν έδωσε προϊόν.

Ολοκληρώθηκε αυτή η σειρά πειραμάτων με ένα τελευταίο κύκλο αντιδράσεων PCR στις οποίες προστέθηκε το στέλεχος του *P. syringae*, antarc O2RA στα υπό παρατήρηση στελέχη. Το X χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, αντιπροσωπευτικό στέλεχος των αρνητικών στην οξειδάση το *Cit7*, ενώ αντιπροσωπευτικό στέλεχος των θετικών στην οξειδάση το X3.

Οι δοκιμές που έγιναν είναι οι παρακάτω:

Χρησιμοποιώντας το ζεύγος του *inaW2*.

1. Dimou et al., (177), με το βήμα επανασύνδεσης στους 59°C.
2. Touch Down από τους 55°C έως τους 50 °C.

Σε καμία από αυτές τις δύο δοκιμές δεν λάβαμε προϊόν.

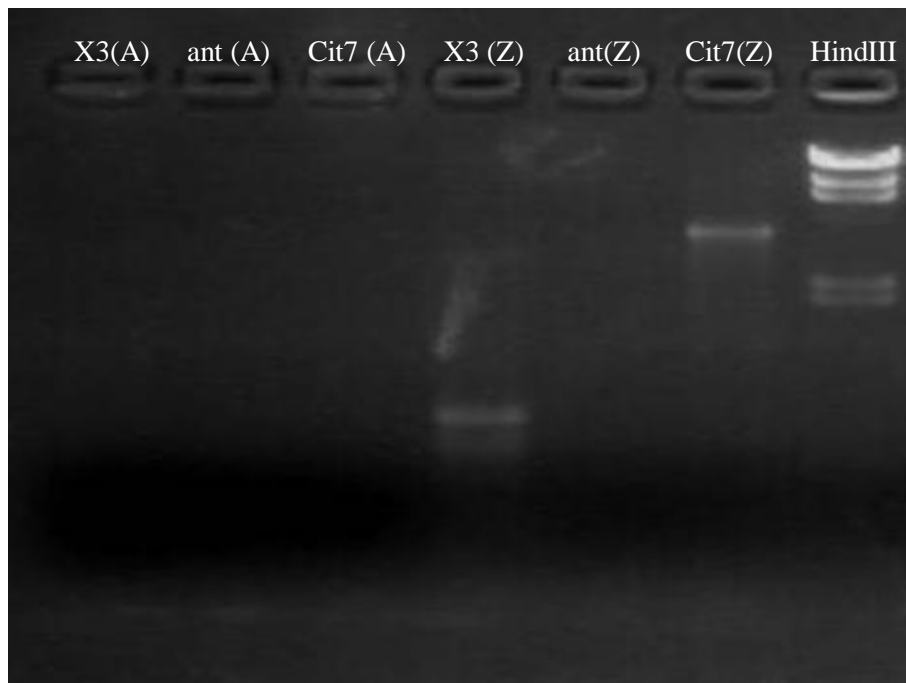
Με τη χρησιμοποίηση των ζευγών των *inaW1* και *inaW2*.

3. Dimou et al., (157).
4. Touch Down από τους 60°C.

Όπως στις παραπάνω δοκιμές, έτσι και σε αυτές δεν λάβαμε προϊόν.

Χρησιμοποιώντας τα ζεύγη των *inaA* και *inaZ*.

5. Dimou et al., (157).
6. Touch Down από τους 60°C.



Εικόνα 15. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου Dimou et al., (157). Στις παρενθέσεις τα A και Z αφορούν στους εκκινητές των γονιδίων *inaA* και *inaZ*.

Στην πέμπτη δοκιμή επιβεβαιώνεται η χρήση του αντιπροσωπευτικού στελέχους των αρνητικών στην οξειδάση Cit7 όταν χρησιμοποιούνται οι εκκινητές για το γονίδιο *inaZ*, κατά τα άλλα δεν λάβαμε προϊόν από το antarc O2RA.

Στην έκτη δοκιμή δεν λάβαμε προϊόν. Ανακεφαλαιώνοντας, σε καμία από τις δοκιμές που κάναμε δεν λάβαμε προϊόν από το στέλεχος του *P. syringae*, antarc O2RA.

Τέλος, έγιναν αντιδράσεις PCR με όλα τα ζεύγη των εκκινητών και το πρωτόκολλο των Dimou et al., (157) χρησιμοποιώντας το GP8 της συλλογής αλλά όπως και στην παραπάνω περίπτωση δεν λάβαμε απολύτως τίποτα.

#### *5.5. Απομόνωση ολικού DNA από περιβαλλοντικό δείγμα για ανίχνευση γονιδίων *Ina*.*

Δυστυχώς ενώ το πρωτόκολλο φάνηκε να λειτουργεί σε δείγματα χώματος από την Οινόη, δεν έδωσε αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε σε δείγματα χιονιού, είτε τηρήθηκε απaráλλακτο, είτε τροποποιήθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης πάρθηκαν δείγματα τόσο από γεωργικά όσο και από μη γεωργικά ενδιαιτήματα, με σκοπό την πιστοποίηση της ύπαρξης σε αυτά πληθυσμών παγοπυρηνωτικών βακτηρίων.

Η ύπαρξη ψευδομονάδων και άλλων παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε όλα τα γεωργικά ενδιαιτήματα, όπως δείγματα φύλλων εσπεριδοειδών (Λεμονιά, Μανταρινιά, Πορτοκαλιά και Φράπα) και ελιάς που βρίσκονται στο δενδροκομείο του Γ.Π.Α., φύλλα ελιάς από τον αερολιμένα του Τατοΐου, καθώς και φύλλα σιταριού από την περιοχή της Οινόης, δείγματα από τη ριζόσφαιρα της παραπάνω καλλιέργειας και χώμα από ακαλλιέργητο χωράφι, δίπλα στο χωράφι της καλλιέργειας, ήταν κάτι αναμενόμενο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, κατά την οποία βακτήρια μπορούν να εδραιώσουν μεγάλους πληθυσμούς στις εναέριες επιφάνειες ενός ευρέος φάσματος φυτικών ειδών(1).

Επόμενα δείγματα που πάρθηκαν από ενδιαιτήματα μακριά από γεωργικές ή άλλες ανθρωπογενείς δραστηριότητες και πάλι απέδωσαν πληθυσμούς αυτών των βακτηρίων. Τέτοια δείγματα αφορούν σε χώμα από την περιοχή της Πάρνηθας, συγκεκριμένα από τον Πύργο του ΟΤΕ καθώς και από το γήπεδο που βρίσκεται πλησίον του εγκαταλελειμένου ξενοδοχείου Ξενία. Νερό συλλέχθηκε από ποτάμι και λίμνη της περιοχής των Γρεβενών και χιόνι από το Βέρμιο, τα Γρεβενά, το Καρπενήσι και την Πάρνηθα.

Η ύπαρξη βακτηρίων γεωργικού ενδιαφέροντος σε μη γεωργικά ενδιαιτήματα μας οδηγεί στη σκέψη ότι από την επιφυτική φάση μπορούν να διασπαρούν μέσω αερολυμάτων. Η ανοδική μετακίνηση του *P. syringae* είναι ένα σημαντικό μονοπάτι για τη διασπορά του, με καθαρή ανοδική ροή από τις φυτικές κόμεις, της τάξης των  $10^5$  κυττάρων ανά τετραγωνικό μέτρο ανά ώρα (2). Το *P. syringae* είναι ένας από τους λίγους μικροοργανισμούς γνωστούς για τη διασπορά τους ακόμα και στα νέφη (3, 4) ενώ έχει βρεθεί σε σταγόνες βροχής (5) και στο χιόνι (158). Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, φαίνεται ότι το *P. syringae* και άλλα παγοπυρηνωτικά βακτήρια επιζούν, διαδίδονται και πολλαπλασιάζονται σε ένα ευρύ φάσμα βιοτόπων και θώκων χρησιμοποιώντας τον παγκόσμιο κύκλο του νερού.

Στο δεύτερο μέρος αυτής της μελέτης εξερευνήθηκε η ικανότητα διαφόρων μεθόδων για την ταχύτερη, απλούστερη και πιο αξιόπιστη ανίχνευση της παρουσίας παγοπυρηνωτικών βακτηρίων σε δείγματα διαφόρων ειδών.

Κατά την προσπάθεια εύρεσης ενός επιπρόσθετου τρόπου ταυτοποίησης της παγοπυρηνωτικής ικανότητας άγνωστων βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού. Χρησιμοποιήθηκαν αντιορροί που έχουν εξειδίκευση για τα βακτήρια *Pseudomonas syringae*. Από όλο τον όγκο των δοκιμών που έλαβαν χώρα χρησιμοποιώντας βακτήρια της συλλογής του Πανεπιστημίου καθώς και βακτήρια που απομονώθηκαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, δυστυχώς δεν λήφθηκαν αξιόπιστα αποτελέσματα γιατί κανείς αρνητικός μάρτυρας δε λειτούργησε ως τέτοιος.

Μετά τον ανοσοφθορισμό επιχειρήθηκε να αξιολογηθεί η μέθοδος της PCR και τα αποτελέσματα αυτή τη φορά ήταν ανάμεικτα.

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων σαρώθηκαν κάποια στελέχη από τη συλλογή του Πανεπιστημίου τόσο αρνητικών όσο και θετικών στη δοκιμή οξειδάσης, με ένα ζεύγος εκκινητών για την αξιολόγηση αυτών των εκκινητών. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που περιγράφονται στο 6<sup>ο</sup> κεφάλαιο για τα γονίδια *inaZ*, *inaA*, *inaW1*, *inaW2*.

Σχετικά με τους εκκινητές για το γονίδιο *inaZ* δοκιμάστηκαν με επιτυχία τα πρωτόκολλα Touch Down από τους 60°C, Touch Up από τους 50°C και τέλος το πρωτόκολλο Dimou et al., στα στελέχη της συλλογής που ήταν αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές για το γονίδιο *inaZ*.

Με τους εκκινητές για τα γονίδια *inaA*, *inaW1* και *inaW2* όλες οι δοκιμές ήταν ανεπιτυχείς και κανένα πρωτόκολλο δεν απέδωσε ικανοποιητικά και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Τέλος έγινε προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για απομόνωση ολικού DNA από περιβαλλοντικό δείγμα για την ανίχνευση γονιδίων *Ina*. Σε όλες τις δοκιμές που έγιναν, αυτή η μέθοδος φαίνεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση βακτηριακού DNA από χώμα, όμως υπάρχει αδυναμία αυτή η απομόνωση να γίνει σε δείγμα νερού ή χιονιού.

1. Hirano, S.S., Upper, C.D., 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 155–177.
2. Lindemann, J., Constantinidiou, H.A., Barchet, W.R., Upper, C.D., 1982. Plants as source of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1059–1063.
3. Jayaweera, K., Flanagan, P., 1982. Investigation of biogenic ice nuclei in the Arctic atmosphere. *Geophys. Res. Lett.* 9, 94–97.
4. Sands, D.C., Langhans, V.E., Scharen, A.L., de Smet, G., 1982. The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications. *J. Hungarian Meteorol. Serv.* 86, 148–152.
5. Constantinidou, H.A., Hirano, S.S., Baker, L.S., Upper, C.D., 1990. Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria: the role of rain. *Phytopathology* 80, 934–937.
6. Lindow, S.E., 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21, 363–384.
7. Morris, C.E., Georgakapolous, D., Sands, D.C., 2004. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J. Phys. IV, France* 121, 87–103.
8. Harrison, R. M., Jones, A. M., Biggins, P. D., Pomeroy, N., Cox, C. S., Kidd, S. P., Hobman, J. L., Brown, N. L., and Beswick, A.: Climate factors influencing bacterial count in background air samples, *Int. J. Biometeorol.*, 49(3), 167–78, 2005.
9. V. T. J. Phillips<sup>1</sup>, C. Andronache<sup>2</sup>, C. E. Morris<sup>3</sup>, and D. C. Sands<sup>4</sup>, Impacts from ice-nucleating bacteria on deep convection: implications for the biosphere-atmosphere interaction in climate change. 1040, 2008.



10. Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Löfflund, M., Giebl, H., Hitzemberger, R., Zibuschka, F., and Puxbaum, H.: The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols, *Atmos. Res.*, 64(1–4), 109–119, 2002.
11. Vali, G., Chistensen, M., Fresh, R. W., Galyan, E. L., Maki, L. R., and Schnell, R. C.: Biogenic ice nuclei, II - Bacterial sources, *J. Atmos. Sci.*, 33, 1565–1570, 1976.
12. Lindow, S. E., Arny, D. C., and Upper, C. D.: Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature, *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(6), 831–838, 1978.
13. Gross, D. C., Cody, Y. S., Proebsting, E. L., Rademaker, G. K., and Spotts, R. A.: Distribution, population dynamics, and characteristics of ice nucleation-active bacteria in deciduous fruit tree orchards, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(6), 1370–1379, 1983.
14. Hirano, S. S., Baker, L. S., and Upper, C. D.: Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation active bacteria and frost injury, *Plant Physiol.*, 77(2), 259–265, 1985.
15. Sands, D. C., Langhans, V. E., Scharen, A. L., and deSmet, G.: The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications. *J. Hungarian Meteorol. Serv.*, 86, 148–152, 1982.
16. Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffire, A., Yan, S., Dominguez, H., and Thompson, B.: The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle., *Journal*, in press, doi:10.1038/ismej.2007.113, 2008a.
17. Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Paolo, L., Mailhot, G., and Delort, A.-M.: Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at

- the Puy de Dme: major groups and growth abilities at low temperatures, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59, 242–254, 2007.
18. Caristi, J., Sands, D. C., and Georgakopoulos, D. G.: Simulation of epiphytic bacterial growth under field conditions, *Simulation*, 56, 295–301, 1991.
19. Linton, A. H.: Influence of external factors on viability of micro-organisms, in: *Micro-organisms, Function, Form and Environment*, edited by: Hawker, L. and Linton, A., American Elsevier Publishing Company, New York, USA, 1971.
20. *Science* 29 February 2008: Vol. 319 no. 5867 p. 1214 DOI: 10.1126/science.1149757. Ubiquity of Biological Ice Nucleators in Snowfall. Brent C. Christner, Cindy E. Morris, Christine M. Foreman, Rongman Cai and David C. Sands.
21. Junge, K. and Swanson, B. D.: High-resolution ice nucleation spectra of sea-ice bacteria: implications for cloud formation and life in frozen environments, *Biogeosciences Discuss.*, in press, 2007.
22. Morris, C. E., Sands, D. C., Bardin, M., Jaenicke, R., Vogel, B., Leyronas, C., Ariya, P. A., and Psenner, R.: Microbiology and atmospheric processes: an upcoming era of research on biometeorology, *Biogeosciences Discuss.*, 5, 191–212, 2008b.
23. McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., Jones, A.L., 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 443–465.
24. Spotts, R.A., Cervantes, L.A., 1995. Copper, oxytetracycline and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. *Plant Dis.* 79, 1132–1135.
25. Sikorski, J., Mõhle, M., Wackernagel, W., 2002. Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local

- Pseudomonas stutzeri* populations from marine sediment and soils. *Environ. Microbiol.* 4, 465–478.
26. Vali, G., 1996. Ice nucleation—a review. In: Kulmala, M., Wagner, P. (Eds.), *Nucleation and Atmospheric Aerosols*. Pergamon Press, Oxford, pp. 271–279.
27. Caruso, P., Palomo, J.L., Bertolini, E., Alvarez, B., Lopez, M.A., Biosca, E., 2005. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 140–148.
28. Sarkar, S.F., Guttman, D.S., 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1999–2012.
29. Williams, H.G., Day, M.J., Fry, J.C., Stewart, G.J., 1996. Natural transformation in river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2994–2998.
30. Christersson, L. & Sandstedt, R. 1978. Short-temperature variation in needles of *Pinus sylvestris* L. *Can. J. For. Res.* 8, 480-482.
31. Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Academic press, New York.
32. Franks, F. 1985. Biophysics and biochemistry at low temperatures. Cambridge University Press.
33. Lindow, S. E. 1983. Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice Nucleation active bacteria. *Plant Dis.* 67, 327-333.
34. Kaneda, T. 1986. Seasonal population changes and characterization of icenucleating bacteria in farm fields of central Alberta. *Appl. and Environ. Microbiol.* 52, 173-178.

35. Gross, D. C., Proebsting, E. L. Jr. & Andrews, P. K. 1984. The effects of ice nucleation active bacteria on the temperatures of ice nucleation and low temperature susceptibilities of *Prunus* flower buds at various stages of development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109, 375-380.
36. Proebsting, E. L. Jr. & Mills, H. H. 1978. Low temperature resistance of developing flower buds of six deciduous fruit species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 103, 192-198.
37. Maki, L. R., Galyon, E. L., Chang, C. M. & Galdwell, D. R. 1974. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol.* 28, 456-459.
38. Arny, D. C., Lindow, S. E. & Upper, C. D. 1976. Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature* 262, 282-284.
39. Lindow, S. E. 1982. Population dynamics of epiphytic ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria. In: *Plant Cold Hardiness and Freezing stress-Mechanisms and Crop implications*. (eds). Li, P. H., Sakai, A. II: 395-416. New York: Academic Press. 694 pp.
40. Single, W. V. & Olien, C. R. 1967. Freezing processes in wheat stems. *Aust. J. Biol. Sci.* 20, 1025-1028.
41. Lindow, S. E. 1990. Design and results of field trials of ice- recombinant *Pseudomonas syringae* strains. Pages 61-69. In: *Risk assessment in agricultural biotechnology: Proceeding of the international conference*. Marois, J., and Bruhning. (eds). University of California, Oakland, CA.
42. Fuller, M. P. & Wisniewski, M. 1998. The use of infrared thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *Journal of Thermal Biology* 23, 81-89.

43. Pearce, R. S. & Fuller, M. P. 2001. Freezing of barley (*hordeum*) studied by infrared video thermography. *Plant Physiology* 125, 227-240.
44. Lindow, S. E., Amy, D. C., and Upper, C. D. (1978) *Erwinia herbicola*: a bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn. *Phytopathology* 68, 523-527.
45. Maki, L. R., Galyon, E. L., Chang-Chien, M., and Caidwell, D. R. (1974) Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *App!. Microbiol.* 28, 456-460.
46. Maki, L. R., and Willoughby, K. J. (1978) Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. *J. AppI. Meteorol.* 17, 1049-1053
47. Paulin, J. P., and Luisetti, J. (1978) Ice nucleation activity among phytopathogenic bacteria. In *Proc. 4th mt. Conf on Plant Pathogenic Bacteria (Station de Pathologic Vegetale et Phytobacteriologie eds) Vol. II, pp. 725-733, Angers, France.*
48. Lim, H. K., Orser, C. S., Lindow, S. E., and Sands, D. C. (1987) *Xanthomonas campestru* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. *Plant Dic.* 71, 994-997.
49. Wolber, P. K. (1992) Bacterial ice nucleation. *Ado. Microbial Physiol* 34, 205-237.
50. Warren, G. J. (1987) Bacterial ice nucleation: molecular biology and applications. *Biotechnol Gene. Engin. Rev.* 5, 107-135.
51. Wolber, P. K., and Green, R. L. (1990) Detection of bacteria by transduction of ice nucleation genes. *Trends Biotechnol.* 8, 276.
52. Ramstedt, M., Åström, B. & von Fircks, H. A. 1994. Dieback of poplar and willow caused by *Pseudomonas syringae* in combination with freezing stress. *Eur. J. For. Path.* 24, 305-315.

53. Nejad, P., Ramstedt, M. & Granhall, U. 2002. Synergistic effect between frost damage and bacterial infection in *Salix* plants. Poster presented at International Poplar Symposium III, on Basic and Applied Aspects of Poplar and Willow Biology; held in Uppsala, Sweden, August 26-29.
54. Nejad, P., Ramstedt, M. & Granhall, U. 2004. Pathogenic ice-nucleation active bacteria in willows for short rotation forestry. *For. Path.* 34, 369-381.
55. Cambours, M. A. 2004. Ice Nucleation-Active and Pathogenic Bacteria in Swedish and Estonian *Salix* Short-Rotation Forestry Plantations Suffering from Frost-Related Dieback. Licentiate thesis. Swe. Univ. Agri. Sci. Uppsala, Sweden.
56. Lansade, J. A. 1946. Recherches sur le chancre de peuplier en France. *Ann. Epiphyt.* 12, 23-31.
57. Sabet, K. A. 1953. Studies on the bacterial dieback and canker disease of poplar III: Freezing in relation to the disease. *Ann. Appl. Biol.* 40, 645-50.
58. Dong, Ai-Rong., Zhang, Xin-Yu., Wang, Yuan-Tao., Zheng, Qing- Zhu. & Li, Jian. 2001. Pathogenic and physiological mechanisms of poplar ice-nucleation active bacterial canker. *J. For. Res.* 12 (4), 253-256.
59. Vali, G. 1971. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous Freezing nucleation of supercooled liquids. *J. Atmos. Sci.* 28, 402-409.
60. von Fircks, H. A. & Verwijst, T. 1993. Plant viability as a function of temperature stress. The Richards function applied to data from freezing tests of growing shoots *Plant Physiol.* 103, 125-130.

61. Lindow, S. E. (1987) Competitive exclusion of epiphytic bacteria by Ice mutants of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ. Microbiol* 53, 2520-2527.
62. Lindow, S. E. (1990) Bacterial ice nucleation measurements. In *Methods in Phytobacteriology* (Sands, D., Klement, Z., and Rudolf, K. eds) pp. 428-434, Akademia Kiado, Budapest.
63. Govindarajan, A. G., and Lindo S. E. (1988) Size of bacterial ice nucleation sites measured in situ by radiation inactivation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1334-1338.
64. Rogers, J. S., Stall, R. E., and Burke, M. J. (1987) Low temperature conditioning of the ice nucleation active bacterium, *Erwinia herbicola*. *Cryobiology* 24, 270-279.
65. Lindow, S. E. (1983) Kinetics of changes in ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* following temperature shifts. *Phytopathology* 73, 809 (abstr.).
66. Hirano, S. S., Maher, E. A., Kelman, A., and Upper, C. D. (1978) Ice nucleation activity of fluorescent plant pathogenic pseudomonads. In *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers, France (Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, eds) Vol. 2, pp. 717-725, Beaucouze, France. Institut National de la Recherche Agronomique.
67. Lindow, S. E., Amy, D. C., Barchet, W. R., and Upper, C. D. (1978) The role of bacterial ice nuclei in frost injury to sensitive plants. In *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress* (Li, P., ed.) pp. 249-263, Academic Press, New York.
68. Lindow, S. E., Amy, D. C., and Upper, C. D. (1982) Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. *Plant Physiol* 70, 1084-1089.

69. Cary, J. W., and Mayland, H. F. (1970) Factors influencing freezing of supercooled water in tender plants. *Agron. j* 62, 715-719.
70. Schnell, R. C., and Vali, G. (1972) Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation. *Nature (London)* 236, 163-165.
71. Schnell, R. C., and Vali, G. (1973) World-wide sources of leave-derived freezing nuclei. *Nature (London)* 246, 212-213.
72. Schnell, R. C., and Vail, G. (1976) Biogenic ice nuclei, Part 1. Terrestrial and marine sources. *J Atmos. Sci.* 33, 1554-1564.
73. Rosinski, J., and Parungo, F. (1966) Terpene-iodine compounds as ice nuclei. *J. Appl. Meteorol.* 5, 119-123.
74. Power, B. A., and Power, R. F. (1962) Some amino acids as ice nucleators. *Nature (London)* 194, 1170-1171.
75. Mason, B. J., and Maybank, J. (1958) Ice-nucleating properties of some natural mineral dusts. *Q J. R. Meteorol. Soc.* 84, 235-241.
76. Mason, B. J. (1960) Ice-nucleating properties of clay minerals and stony meteorites. *Q J. R. Meteorol. Soc.* 84, 553-556.
77. Mason, B. J., and Hallett, J. (1957) Ice-forming nuclei. *Nature (London)* 197, 357-359.
78. Lindow, S. E., and Connell, J. E. (1984) Reduction of frost injury to almond by control of ice nucleation active bacteria. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109, 48-53
79. Lindow, S. E. (1985) Strategies and practice of biological control of ice nucleation active bacteria on plants. In *Microbiology of the Phyllosphere* (Fokkema, N., ed) pp. 293-311, Cambridge University Press, London.



80. Hirano, S. S., and Upper, C. D. (1983) Ecology and epidemiology of foliar plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21, 243-269.
81. Hirano, S. S., and Upper, C. D. (1986) Temporal, spatial and genetic variability of leaf-associated bacterial populations. In *Microbiology of the Phyllosphere* (Fokkema, N. J., and Van Den Heuvel, J., eds) pp. 235-251, Cambridge University Press, London.
82. Andersen, G. L., Menkissoglu, O., and Lindow, S. E. (1991) Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit tree in California. *Phytopathology* 81, 648-656.
83. Burke, M. J., Gusta, L. A., Quamme, H. A., Weiser, C. J., and Li, P. H. (1976) Freezing and injury to plants. *Annu. Rev. Plant Physiol* 27, 507- 528.
84. Lindow S. E. (1985) Integrated control and role of antibiosis in biological control of fireblight and frost injury. In *Biological Control on the Phylloplane* (Windels, C., and Lindow, S. E., eds) pp. 83-115, American Phytopathological Society Press, Minneapolis
85. Lindow, S. E., and Panopoulos, N. J. (1988) Field tests of recombinant Ice *Pseudomonas syringae* for biological frost control in potato. In *Proc. First International Conference on Release of Genetically Engineered Microorganisms* (Sussman, M., Collins, C. H., and F. A. Skinner, eds) pp. 121-138, Academic Press, London.
86. Lindow, S. E., Amy, D. C., and Upper, C. D. (1983) Biological control of frost injury II: establishment and effects of an antagonistic *Erwinia herbicola* isolate on corn in the field. *Phytopathology* 73, 1102-1106.
87. Rajashekar, C., Li, P. H., and Carter, J. V. (1983) Frost injury and heterogeneous ice nucleation in leaves of tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiol* 71, 749-755.

88. Baertlein, D. A., Lindow, S. E., Panopoulos, N. J., Lee, S. P., Mmdrinos, M. N., and Chen, T. H. (1992) Expression of a bacterial ice nucleation gene in plants. *Plant Physiol* 100, 1730-1736.
89. Margartis, A., and Bassi, A. S. (1991) Principles and biotechnological applications of bacterial ice nucleation. *Crit. Rev. Biotechnol* 11, 277-295.
90. Levin, Z., Yankofski, S. A., Pardes, D., and Magal, N. (1987) Possible application of bacterial condensation freezing nuclei to artificial rainfall enhancement. *J. Climate Appl. Meteorol.* 26, 1188-1197.
91. Arai, S., and Watanabe, M. (1986) Freeze texturing of food materials by ice-nucleation with the bacterium *Erwinia annas*. *Agr. Biol. Chem.* 50, 169-175.
92. Yankofsky, S. A., Levin, Z., Bertold, T., and Sandlerman, N.: Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei, *J. Appl. Meteorol.*, 20, 1013–1019, 1981.
93. Levin, Z. and Yankofsky, S. A.: Contact Versus Immersion Freezing of Freely Suspended Droplets by Bacterial Ice Nuclei, *J. Appl. Meteorol.*, 22, 1964–1966, 1983.
94. Ward, P. J. and DeMott, P. J.: Preliminary experimental evaluation of Snomax, *Pseudomonas syringae*, as an artificial ice nucleus for weather modification, *J. Wea. Mod.*, 21, 9–13, 1989.
95. Wood, S. E., Baker, M. B., and Swanson, B. D.: Instrument for studies of homogeneous and heterogeneous ice nucleation in freefalling supercooled water droplets, *Rev. Sci. Instrum.*, 73, 3988–3996, 2002.
96. Mohler, O., Böttner, S., Linke, C., Schnaiter, M., Saathoff, H., Stetzer, O., Wagner, R., Krämer, M., Mangold, A., Ebert, V., and Schurath, U.: Effect of

- sulfuric acid coating on heterogeneous ice nucleation by soot aerosol particles, *J. Geophys. Res.*, 110, D11210, doi:10.1029/2004JD005169, 2005.
97. Mohler, O., Field, P. R., Connolly, P., Benz, S., Saathoff, H., Schnaiter, M., Wagner, R., Cotton, R., Krämer, M., Mangold, A., and Heymsfield, A. J.: Efficiency of the deposition mode ice nucleation on mineral dust particles, *Atmos. Chem. Phys.*, 6, 3007–3021, 2006.
98. Teller, A. and Levin, Z.: The effects of aerosols on precipitation and dimensions of subtropical clouds: a sensitivity study using a numerical cloud model, *Atmos. Chem. Phys.*, 6, 67–80, 2006.
99. Phillips, V. T. J., Andronache, C., Sherwood, S. C., Bansemer, A., Conant, W. C., Demott, P. J., Flagan, R. C., Heymsfield, A., Jonsson, H., Poellot, M., Rissman, T. A., Seinfeld, J. H., Vanreken, T., Varutbangkul, V., and Wilson, J. C.: Anvil glaciation in a deep cumulus updraught over Florida simulated with the Explicit Microphysics Model. I: Impact of various nucleation processes, *Q. J. Roy. Meteor. Soc.*, 131, 2019–2046, 2005.
100. van den Heever, S. C., Carrico, G. G., Cotton, W. R., DeMott, P. J., and Prenni, A. J.: Impacts of nucleating aerosol on Florida storms. Part I: Mesoscale simulations, *J. Atmos. Sci.*, 63, 1752–1775, 2006.
101. Hew, C. L. and Yang, D. S. C.: Protein interaction with ice. *Eur. J. Biochem.*, 203, 33-42 (1992).
102. Obata, H., Saeki, Y., Tanishita, J., Tokuyama, T., Hori, H., and Higashi, Y.: Identification of an ice-nucleating bacterium KUIN-1 as *Pseudomonas fluorescens* and its ice nucleation properties. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1761-1766 (1987).
103. Obata, H., Nakai, T., Tanishita, J., and Tokuyama, T.: Identification of an ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties. *J. Ferment. Bioeng.*, 67, 143-147 (1989).

104. Obata, H., Takinami, K., Tanishita, J., Hasegawa, Y., Kawate, S., Tokuyama, T., and Ueno, T.: Identification of a new ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 725-730 (1990).
105. Pouleur, S., Richard, C., Martin, J. G., and Autoun, H.: Ice nucleation activity in *Fusarium acuminatum* and *Fusarium avenaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2960-2964 (1992).
106. Obata, H., Tanaka, T., Kawahara, H., and Tokuyama, T.: Properties of cell-free ice nuclei from ice nucleation-active *Pseudomonas fluorescens* KUIN-1. *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 19-24 (1993).
107. Kawahara, H., Mano, Y., and Obata, H.: Purification and characterization of extracellular ice-nucleating matter from *Erwinia uredovora* KUIN-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1429-1432 (1993).
108. Phelps, P., Geddings, T. H., Prochoda, M., and Fall, R.: Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.*, 167, 496-502 (1986).
109. Fukuosa, S., Kamishima, H., Tamiya, E., and Karube, I.: Spontaneous release of outer membrane vesicles by *Erwinia carotovora*. *Microbios*, 72, 167-173 (1992).
110. Michigami, Y., Watabe, S., Abe, K., Obata, H., and Arai, S.: Cloning and sequencing of an ice nucleation active gene of *Erwinia uredovora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 762-764 (1994).
111. Fall, R., and Wolber, P. K.: Biochemistry of bacterial ice nuclei, Ch4, p.64. In Lee, R. E., Jr., Warren, G. J., and Gusta, L. V. (ed.), *Biological ice nucleation and its applications*. APS Press, St. Paul, MN (1995).

112. Govindarajan, A., and Lindow, S. E.: Phospholipid requirement for expression of ice nuclei in *Pseudomonas syringae* and in vitro. *J. Biol. Chem.*, 263, 9333-9338 (1998).
113. Kozloff, L. M., Turner, M. A., and Arellano, F.: Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes. *J. Bacteriol.*, 173, 6528-6536 (1991).
114. Turner, M. A., Arellano, F., and Kozloff, L. M.: Components of ice nucleation structures of bacteria. *J. Bacteriol.*, 173, 6515- 6527 (1991).
115. Kawahara, H., Mano, Y., Hamada, R., and Obata, H.: Role of sperimidine in the ice-nucleating activity of the EIM from *Erwinia uredovora* KUIN-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 2201-2206 (1994).
116. Michigami, Y., Abe, K., Iwabuchi, K., Obata, H., and Arai, S.: Formation of ice-nucleation-active vesicle in *Erwinia uredovora* at low temperature and transport InaU molecules into shed vesicles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1996-1998 (1995).
117. Ohgama, H., Izumi, K., Hasegawa, Y., Obata, H., and Tokuyama, T.: Expression of the ice nucleation active gene of a novel plasmid pNVR-1 from *Pseudomonas viridiflava* in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Ferment. Bioeng.*, 74, 73-76 (1992).
118. Kawahara, H., Matsishita, M., Yamade, K., and Obata, H.: The control of the production and secretion of extracellular ice-nucleating material of *Erwinia uredovora* KUIN-3. *Biocontrol Sci.*, 4, 9-16 (1999).
119. Lindow, S. E., Lahue, E., Govindarajan, A. G., Panopoulos, N. J., and Gies, D. (1989) Localization of ice nucleation activity and the iceC gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*. *Mol. Plant Path.* 2, 262-272

120. Wolber, P. K., Deininger, C. A., Southworth, M. W., Vandekerckhove, J., Montegu, M., and Warren, G. J. (1986) Identification and purification of a bacterial ice nucleation protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7256-7260.
121. Phelps, P., Giddings, T. H., Prochoda, M., and Fall, R. (1986) Release of cell free ice nuclei by *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.* 167, 496-502.
122. Warren, G., and Corotto, L. (1989) The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas syringae*. *Gene* 83, 239-242.
123. Burke, M. J., and Lindow, S. E. (1990) Surface properties and size of the ice nucleation site in ice nucleation active bacteria: theoretical considerations. *Cryobiology* 27, 80-84.
124. Mueller, G. M., Wolber, P. K., and Warren, G. J. (1990) Clustering of ice nucleation protein correlates with ice nucleation activity. *Cryobiology* 27, 416-422
125. Welch, J. F., and Speidel, H. K. (1989) Visualization of potential bacterial ice nucleation sites. *Cryo Lett.* 10, 309-314
126. Mizuno, H. (1989) Prediction of the conformation of ice-nucleation protein by conformational energy calculation. *Proteins Struct. Func. Genet.* 5, 47-65.
127. Wolber, P., and Warren, G. (1989) Bacterial ice-nucleation proteins *Trends Biochem. Sci.* 14, 179-182.
128. Kajava, A. V., and Lindow, S. E. (1993) A model of the threedimensional structure of ice nucleation proteins. *J. Mol. Biol.* In press.
129. Green, R., and Warren, G. (1985) Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. *Nature (London)* 317, 645-648.

130. Green, R., Corotto, L. V., and Warren, G. J. (1988) Deletion mutagenesis of the ice nucleation gene from *Pseudomonas syringae* S203. *Mol Gen. Genet.* 215, 165-172.
131. Abe, K., Watabe, S., Emori, Y., Watanabe, M., and Arai, S. (1989) An ice nucleation active gene of *Erwinia annas*: sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity. *FEBS Lett.* 238, 297-300
132. Gurian-Sherman, D., and Lindow, S. E. (1993) Isolation and characterization of hydroxylamine-induced mutations in the *Erwinia herbicola* ice nucleation gene that selectively reduce warm temperature ice nucleation activity. *Mol Microbiol* 9, 383-391.
133. Turner, M. A., Arellano, F., and Kozloff, L. M. (1990) Three separate classes of bacterial ice nucleation structures. *J Bacteriol.* 172, 2521-2526.
134. Kozloff, L. M., Turner, M. A., Arellano, F., and Lute, M. (1991) Phosphatidylinositol, a phospholipid of ice-nucleating bacteria. *J Bacteriol.* 173, 2053-2060.
135. Stile, S., and Seemuller, E. (1987) The role of ice formation in the infection of sour cherry leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology* 77, 173-177.
136. ORSER, C. S., B. J. STASKAWICZ, N. J. PANOPOULOS, D. DAHLBECK, and S. E. LINDOW. 1985. Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164:359-366.
137. WARREN, G. L., and P. K. WOLBER. 1987. Heterogeneous ice nucleation by bacteria. *Cryo. Lett.* 8:204-215.

138. WARREN, G. L., L. COROTTO and P. K. WOLBER. 1986. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Res.* 20:8047-8060.
139. ZHAO, J.-L., and C. S. ORSER. 1990. Conserved repetition in the ice nucleation gene *inaX* from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Mol. Gen. Genet.* 223:163-166.
140. WARREN, G. L., and P. K. WOLBER. 1991. Molecular aspects of microbial ice nucleation. *Mol. Microbiol.* 5:239-243.
141. Wolber, P. K., and Green, R. L. (1990) Detection of bacteria by transduction of ice nucleation genes. *Trends Biotechnol.* 8, 276.
142. Burlage, R. S., Saylor, G. S., and Larimer, F. (1990) Monitoring of naphthalene catabolism by bioluminescence with *nah-lux* transcriptional fusions. *J. Bacteriol.* 172, 4749-4757.
143. Lindgren, P. B., Frederick, R., Govindarajan, A. G., Panopoulos, N.J., Staskawicz, B. J., and Lindow, S. E. (1989) An ice nucleation reporter gene system: identification of inducible pathogenicity genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *EMBO J* 8, 1291-1301.
144. Rahme, L. G., Mindrinos, M. N., and Panopoulos, N. J. (1991) The genetic and transcriptional organization of the *hr/s* cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 173, 575-586.
145. LaDuca, R. J., Rice, A. F. & Ward, P. J. 1995. Application of biological ice nucleation in spray ice technology. In: *Biological Ice Nucleation and its Application in APS press.* (eds). Lee, R. E.; Warren, G. J.; Gusta, L. V. pp. 337-350.
146. Goodnow, R. A., Harrison, M. D., Morris, J. D., Sweeting, K. B. & LaDuca, R. J. 1990. Fate of ice nucleation-active *Pseudomonas syringae*



- strains in alpine soils and waters and in synthetic snow samples. *Appl. Environ. Micro.* 56, 2223-2227.
147. Cindy E. Morris, Linda L. Kinkel, Kun Xiao, Philippe Prior, David C. Sands. 2006. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*., 85.
148. Michele Nemecek-Marshall, Richard Laduca, and Ray Fall. 1993. High-Level Expression of Ice Nuclei in a *Pseudomonas syringae* Strain Is Induced by Nutrient Limitation and Low Temperature.
149. SNIDER J.R., LAYTON R.G., CAPLE G. & CHAPMAN D. 1985. Bacteria as condensation nuclei. *Journal de Recherches Atmosphériques* 19: 139-145.
150. LINDEMANN J. & UPPER C.D. 1985. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 1229-1232.
151. HIRANO S.S. & UPPER C.D. 1989. Diel variation in population size and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* on snap bean leaflets. *Applied Environmental Microbiology* 46: 1370-1379.
152. Sattler, B. et al. 2002. Clouds as habitat and seeders of active bacteria. Proc. SPIE-The International Society for Optical Engineering 4495 (Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology IV): 211-222.
153. Nicholson S., *Prog. Phys. Geography* 12 (1988) 36-65.
154. Otterman J., Manes A., Rubin S., Alpert P., Starr D.O.C., *Bound.-Layer Meteor.* 53 (1990) 333-351.
155. Segal M., Pan Z., Turner R.W., Takle E.S., *J. Appl. Meteorol.* 37 (1998) 325-331.

- 
156. Stohlgren T.J., Chase T.N., Pielke R.A., Sr., Kittel T.G.F., Baron J.S., *Global Change Biology* 4 (1998) 495-504.
157. A contribution to the analysis of the genetic diversity of bacterial ice nucleation genes in Hellenic niches. D. Dimou(1), A. Kallimanis(1), A. Perisynakis(1), E. Chatziloukas(2) and C. Drainas. (1) Department of Chemistry, (2) Department of Biological Applications and Technologies University of Ioannina, 45100 Ioannina, Greece.
158. Morris, Science Feb 08, Ariya ENVIRONMENTAL CHEMISTRY Volume: 5 Issue: 6 Pages: 373-381, 2008

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ





Βακτηριακό στέλεχος	Αραίωση	Θερμοκρασία								
		-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9
Φ4α8	1						1	2	5	8
WL15	1/10									0
Φ4α9	1						1	2	7	8
WL16	1/10								3	3
Φ4α7	1						2	3	10	15
WL17	1/10									2
Φ4α14	1					4	17	19	20	
WL18	1/10						3	3	5	6
X2α(2)	1					10	20			
GraPa8	1/10					5	14	20		

	oxidase	O.D.	Αρχική T	Υπερευαισθησία		
P. syringae 31R1	-	1,456	-7	+		
E. coli PT3T7 inaZ	-	1,456	-7	-		
E. coli PCIBRI	-	0,649	-6	+		
P. syringae cit 7	-	1,455	-3	+		
E.herbicola 268Rb-2	-	1,405	-4	+		
kehrv FR01	-	2,399	-6	+		
antarc 02RA	+	1,652	-5	-		
cop5	+	1,456	-5	+		
cop4	+	1,647	-5	+		
cop3	+	2,347	<-9	+		
cop2	+	1,208	-6	+		
cop1	+	2,352	-7	+		
FMn 107	-	1,653	-4	+		
5BFPF 12	-	2,378	<-9	+		
Mti 13	-	2,183	-4	+		
K18-2	+	2,237	-7	+		
B728a	-	2,278	-6	+		
FR1	-	1,669	-5	+		
FR2	-	2,672	-6	+		
MT13	-	1,58	-5	+		
MT42	-	1,37	-5	+		
BPIC 1439	-	2,182	-6	+		
BPIC 1440	-	0,623	-5	+		
LSB1	+	1,576	<-9	+		
LSB2	+	1,607	<-9	+		
LSB4	+	2,371	-9	+		
LSB6	-	2,477	-8	+		
LSB8	+	1,895	<-9	+		
LSB10	+	2,014	<-9	+		
LSB12	+	2,451	-8	+		
LSB14	+	1,865	<-9	+		
LSB22	+	1,026	<-9	+		
LSB23	+	1,29	<-9	+		
LSB24	+	2,256	-9	+		
CC40	-	1,111	-6	+		
CC44	-	1,86	-4	+		
CC94	+	2,491	-5	+		
CC234	-	2,362	-5	+		
X1	+	1,455	-6	+		
X2	+	1,561	-7	+		
X3	+	1,115	-5	+		
X4	+	0,936	-5	+		
X5	+	1,443	-6	+		
X6	+	2,006	-7	+		

X7	+	1,385	-6	+			
X8	+	1,814	-6	+			
X9	+	2,151	-7	+			
X10	+	1,455	-7	+			
X11	+	1,016	-5	+			
X12	+	2,239	-7	+			
X13	+	1,456	-8	+			
X14	+	1,456	-8	+			
X15	+	1,372	<-9	+			
X16	+	1,525	-7	+			
X17	+	1,001	-6	+			
WL1	-	0,096	-5	+			
WL2	-	0,103	-6	+			
WL3	-	0,112	-5	+			
WL4	-	0,102	-5	+			
WL5	-	0,095	-6	+			
WL6	-	0,098	-5	+			
WL7	-	0,344	-5	+			
WL8	-	0,128	-7	+			
WL9	-	0,135	-7	+			
WL10	-	0,11	-5	+			
WL11	-	0,084	-6	+			
WL12	-	0,092	-5	+			
WL13	-	0,082	-5	+			
WL14	-	0,082	-5	+			
WL15	-	0,087	-6	+			
WL16	-	0,079	-6	+			
WL17	-	0,086	-6	+			
WL18	-	0,082	-5	+			
GraPa8	+	0,189	-5	+			



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Δείγμα	Προέλευση	Ημερομηνία	Ολικός Πληθυσμός βακτηρίων	Πληθυσμός φθοριζουσών ψευδομονάδων	Ποσοστό παγοπυρηνωτικών επί του ολικού πληθυσμού	Ποσοστό παγοπυρηνωτικών επί του πληθυσμού των φθοριζουσών	Παρατηρήσεις
Ελιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	16/1/2007	12.500	0	0,000%	0,000%	
Ελιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	22/1/2007	405.333	0	0,000%	0,000%	
Ελιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	26/1/2007	2.000	0	0,000%	0,000%	
Ελιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	30/1/2007	63.200	500	0,000%	0,000%	
Ελιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	19/4/2007	38.500	2.000	0,000%	0,000%	
Ελιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	20/4/2007	41.000	0	0,000%	0,000%	
Ελιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	23/4/2007	10.000	0	0,000%	0,000%	
Ελιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	24/4/2007	15.750	0	0,000%	0,000%	
Ελιά	Αερολιμένας Τατσοίου(1)	11/12/2008	9.222.000	25.250	0,000%	0,000%	
Ελιά	Αερολιμένας Τατσοίου(2)	11/12/2008	17.040.250	18.666	0,000%	0,000%	
Λεμονιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	16/1/2007	2.500	360.000	0,000%	0,000%	
Λεμονιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	22/1/2007	38.166	500	0,000%	0,000%	
Λεμονιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	26/1/2007	8.666	0	0,000%	0,000%	
Λεμονιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	30/1/2007	147.666	2.000	0,000%	0,000%	
Λεμονιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	19/4/2007	107.166	500	0,000%	0,000%	
Λεμονιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	20/4/2007	193.000	2.500	0,000%	0,000%	
Λεμονιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	23/4/2007	10.000	0	0,000%	0,000%	Δεύτερη εφαρμογή της διαδικασίας που εφαρμόστηκε κατά τις 19 και 20/4/2007.
Λεμονιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	24/4/2007	56.750	0	0,000%	0,000%	
Μανταρινιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	16/1/2007	557.166	448.833	0,000%	0,000%	Κατά τη συλλογή των φύλλων αυτής της παρατήρησης, έβρεχε.
Μανταρινιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	22/1/2007	153.000	1.000	0,000%	0,000%	
Μανταρινιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	26/1/2007	19.500	500	0,000%	0,000%	
Μανταρινιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	30/1/2007	50.833	500	0,000%	0,000%	
Μανταρινιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	19/4/2007	8.750	500	0,000%	0,000%	
Μανταρινιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	20/4/2007	156.166	500	0,000%	0,000%	Επανάληψη του Plating με τα φύλλα που χρησιμοποιήθηκαν στις 19/4 και αφού έμειναν εκτός ψυγείου overnight.
Πορτοκαλιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	16/1/2007	15.000	1.000	0,000%	0,000%	
Πορτοκαλιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	22/1/2007	30.400	0	0,000%	0,000%	
Πορτοκαλιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	26/1/2007	5.333	0	0,000%	0,000%	
Πορτοκαλιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	30/1/2007	56.250	0	0,000%	0,000%	
Πορτοκαλιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	19/4/2007	35.250	100	0,000%	0,000%	
Πορτοκαλιά	Δεντροκομείο ΓΠΑ	20/4/2007	77.600	500	0,000%	0,000%	
Φράπα	Δεντροκομείο ΓΠΑ	16/1/2007	12.000	0	0,000%	0,000%	
Φράπα	Δεντροκομείο ΓΠΑ	22/1/2007	98.000	24.500	0,000%	0,000%	
Φράπα	Δεντροκομείο ΓΠΑ	26/1/2007	1.000	0	0,000%	0,000%	
Φράπα	Δεντροκομείο ΓΠΑ	30/1/2007	77.800	15.000	0,000%	0,000%	
Φράπα	Δεντροκομείο ΓΠΑ	19/4/2007	1.000	500	0,000%	0,000%	
Φράπα	Δεντροκομείο ΓΠΑ	20/4/2007	112.800	0	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	27/4/2007	1.228.167	119.000	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	27/4/2007	441.250	22.000	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	27/4/2007	10.270.500	188.333	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	27/4/2007	38.393.333	266.000	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	27/4/2007	12.540.000	3.377.500	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	4/5/2007	12.867.500	1.395.000	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	4/5/2007	5.184.500	323.333	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	4/5/2007	10.395.000	2.762.500	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	4/5/2007	10.377.500	1.712.500	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	4/5/2007	4.492.667	169.500	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	10/5/2007	3.013.167	45.000	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	10/5/2007	7.170.667	47.750	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	10/5/2007	10.955.000	2.440.000	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	10/5/2007	6.088.667	497.500	0,000%	0,000%	
Ριζόσφαιρα	Οινόη	10/5/2007	16.790.000	2.642.500	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	26/4/2007	415.500	13.750	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	26/4/2007	564.000	6.500	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	26/4/2007	505.000	6.000	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	26/4/2007	1.059.333	8.000	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	26/4/2007	60.666	1.500	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	3/5/2007	370.000	14.250	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	3/5/2007	169.833	8.250	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	3/5/2007	611.500	5.500	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	3/5/2007	65.500	8.000	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	3/5/2007	586.500	7.500	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	9/5/2007	604.666	169.250	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	9/5/2007	827.600	3.500	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	9/5/2007	1.886.000	4.250	0,000%	0,000%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	9/5/2007	1.583.167	11.500	0,568%	78,250%	
Φύλλα Σιταριού	Οινόη	9/5/2007	92.333	10.250	0,000%	0,000%	

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις μετρήσεις προέρχονται από χωράφι σπαρμένο με σιτάρι και το χρώμα από χωράφι γειτονικό στο προηγούμενο.

Δείγμα	Προέλευση	Ημερομηνία	Ολικός Πληθυσμός βακτηρίων	Πληθυσμός φθοριζουσών ψευδομονάδων	Ποσοστό παγοπυρηνωτικών επί του ολικού πληθυσμού	Ποσοστό παγοπυρηνωτικών επί του πληθυσμού των φθοριζουσών	Παρατηρήσεις
Υδατα	Γρεβενά Ποτάμι	4/2/2007	11.865.000	6.704.833	5,000%	10,440%	
Υδατα	Γρεβενά Λίμνη	5/2/2007	321.900.000	35.093.333	0,080%	7,900%	
Χιόνι	Γρεβενά (1)	4/2/2007	196.000	21.000	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Γρεβενά (2)	4/2/2007	66.500	3.500	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Βέριμο (1)	5/2/2007	36.750	0	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Βέριμο (2)	5/2/2007	80.500	0	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Βέριμο (3)	5/2/2007	31.500	0	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα (Γήπεδο)(3)	9/2/2007	59.500	10.500	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα (Γήπεδο)(4)	9/2/2007	91.000	7.000	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα (Γήπεδο)(5)	9/2/2007	63.000	17.500	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα (Γήπεδο)(1)	10/2/2007	1.534.750	297.500	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα (Γήπεδο)(2)	10/2/2007	332.500	96.250	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Καρπενήσι (Βελούχι)(1)	22/2/2007	2.993.043	9.465	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Καρπενήσι (Βελούχι)(2)	22/2/2007	15.016	18.550	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Καρπενήσι (Βελούχι)(3)	22/2/2007	64.350	51.975	6,100%	7,600%	
Χιόνι	Καρπενήσι (Βελούχι)(4)	23/2/2007	40.715	15.352	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Καρπενήσι (Βελούχι)(5)	23/2/2007	1.690	0	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα (Καμένα)21/2	13/3/2008	513.000	92.454.000	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα (Καμένα)3/2	13/3/2008	152.250	797.500	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα (Πύργος)3/2	13/3/2008	164.700	0	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα (Γήπεδο)3/2	28/3/2008	3.433.333	0	0,000%	0,000%	
Χιόνι	Πάρνηθα(Γήπεδο)21/2	28/3/2008	211.796.667	0	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	25/4/2007	2.317.167	49.000	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	25/4/2007	7.557.000	464.166	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	25/4/2007	16.857.500	1.957.500	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	25/4/2007	19.865.000	2.045.000	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	25/4/2007	2.483.167	45.750	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	2/5/2007	32.642.500	3.870.000	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	2/5/2007	3.626.667	30.750	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	2/5/2007	1.781.167	28.500	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	2/5/2007	525.000	46.250	0,000%	0,000%	
Χώμα	Οινόη	2/5/2007	3.725.500	494.833	0,000%	0,000%	
Χώμα	Πάρνηθα(Πύργος)(1)	21/12/2007	8.122.500	6.905.000	0,000%	0,000%	
Χώμα	Πάρνηθα(Πύργος)(2)	21/12/2007	42.000.000	6.136.667	0,004%	0,027%	
Χώμα	Πάρνηθα(Γήπεδο)	7/1/2008	11.602.500	1.167.625	0,000%	0,000%	
Χώμα	Πάρνηθα(Γήπεδο)	7/1/2008	24.490.000	1.506.667	0,000%	0,000%	

**Nutrient agar:**

- Nutrient Broth 8gr
- Agar 18gr
- dH<sub>2</sub>O 1000ml

**King's B:**

- Proteose peptone #3 20,0 gr
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 gr
- MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,5 gr
- Agar 15,0 gr
- Glycerol 15,0 ml
- dH<sub>2</sub>O 1000ml

**Luria Broth:**

- Tryptone 10 gr
- NaCl 10 gr
- Yeast Extract 5 gr
- dH<sub>2</sub>O 1000ml

**Φυσιολογικός ορός:**

- NaCl 8gr
- NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O 2.7 gr
- NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 gr
- αποστειρωμένο νερό μέχρι της πλήρωσης του ενός λίτρου.

**10mM ph buffer με pH 6.8:**

- 5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,8 gr
- 5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,4 gr
- dH<sub>2</sub>O 1000 ml

**TSA:**

- TSB 10 %
- Agar 18 gr
- Μηκυτοκτόνα:
- Benomil 250 mg
- Cycloheximide 75 mg
- dH<sub>2</sub>O 1000 ml

**KBC:**

Χρησιμοποιήθηκε η συνταγή του King's B, υπολογίζοντας όμως για ποσότητες των 300 ml και προσθέτοντας νερό μέχρι τα 270 ml. Τα υπόλοιπα 30 ml θα συμπληρωθούν με διάλυμα βορικού οξέος H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.45 gr στα 30 ml), αφού αποστειρωθεί το θρεπτικό και η θερμοκρασία του φτάσει τους 55°C. Την ίδια στιγμή θα προστεθούν και τα αντιβιοτικά:

Cycloheximide: 60 mg (200mg/L)

Cephalexin: 24 mg (80 mg/L)

**KB+:**

Χρησιμοποιώντας τη συνταγή του King's B προστίθεται μείγμα αντιβιοτικών αφού το θρεπτικό έχει φτάσει τους 55°C. Τα παρακάτω αντιβιοτικά διαλύονται σε 2 ml 70% αιθανόλης:

- Rifampicin: 0.5 mg
- Bacitracin: 10.0 mg
- Vancomycin: 6.0 mg
- Cycloheximide: 75.0 mg
- Benomyl: 250.0 mg