

**Universidade Federal de Juiz de Fora  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

**Giselle Santos Cavalcanti Manhães de Andrade**

**ULTRAESTRUTURA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EM  
BACTÉRIAS DE UM ECOSSISTEMA AQUÁTICO AMAZÔNICO**

**JUIZ DE FORA  
2016**

**Universidade Federal de Juiz de Fora  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

**Giselle Santos Cavalcanti Manhães de Andrade**

**ULTRAESTRUTURA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EM  
BACTÉRIAS DE UM ECOSISTEMA AQUÁTICO AMAZÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada à Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rossana Correa Netto de Melo

**JUIZ DE FORA**

**2016**

Manhães, Giselle Santos Cavalcanti de Andrade

Ultraestrutura de Vesículas de Membrana Externa em Bactérias de um Ecossistema Aquático Amazônico/ Giselle S. Cavalcanti Manhães de Andrade. -2016.57f.

Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

1. Bactérias aquáticas. 2. Cultura de bactérias aquáticas. 3. Gram negativas. 4. Microscopia eletrônica de transmissão. 5. Curva de crescimento bacteriano. 6. Ultraestrutura bacteriana. 7. Vesículas de membrana externa.

**Giselle Santos Cavalcanti Manhães de Andrade**

**ULTRAESTRUTURA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EM  
BACTÉRIAS DE UM ECOSISTEMA AQUÁTICO AMAZÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ecologia da  
Universidade Federal de Juiz de Fora,  
como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em  
Ecologia Aplicada à Conservação e  
Manejo de  
Recursos Naturais.

Aprovada em

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Natália Pessoa Noyma, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Kátia Batista Amaral, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup> Rossana Correa Netto de Melo, Dr<sup>a</sup>.- Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## AGRADECIMENTOS

Ao Criador de tudo que é, por todas as oportunidades e aprendizados oferecidos pela vida.

À minha orientadora Rossana Melo que incansavelmente se colocou ao meu lado, nos momentos mais difíceis, e se prontificou a resolver grandes questões, oferecendo todo o suporte acadêmico e emocional, me incentivando em todas as situações.

Agradeço ao professor Fábio Roland, pela parceria e suporte oferecido pelo laboratório de Ecologia Aquática (LEA) da UFJF no desenvolvimento do projeto.

Ao Centro de Microscopia (UFMG) e ao Prof. Hélio Chiarini-Garcia pela colaboração no processamento de microscopia eletrônica.

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular da UFJF, pelo incentivo e parceria: Kennedy, Lívia Andressa, Daniel, Felipe, Victor, professora Heloísa e professora Patrícia.

Agradeço enormemente ao Thiago, que com sua paciência infinita, e palavras sempre de incentivo e apoio, se mostrou com isso ser um grande e querido amigo, com o qual pude contar nas horas mais difíceis. Além de ajudar prontamente em todas as áreas do desenvolvimento desse trabalho.

Guardo comigo um agradecimento especial à Juliana por ser esse ser de luz, que não me permitiu desmoronar. Por ter sido a mão que surgiu no meio da escuridão, e a voz que trouxe alento no meio do desespero. Não tenho como agradecer o suficiente, por todo empenho, parceria, dedicação e auxílio na elaboração desse trabalho. Suas atitudes ultrapassam toda a esfera do simples compromisso profissional, e certamente carregarei esse sentimento de gratidão para o resto da minha vida.

Agradeço também, à minha família, pai, mãe, irmãos, que mesmo distantes representam grande parte do que eu sou.

Aos meus filhos por serem o combustível essencial para eu querer me tornar um ser humano melhor.

Ao meu marido Luciano, por ser a constância apesar das minhas inconstâncias, por me fazer seguir adiante, e incentivar sempre, e nas batalhas da vida, se posicionar sempre ao meu lado. Minha vida se torna melhor com a sua presença.

## Resumo

Vesículas de membrana externa (VMEs) liberadas principalmente por bactérias Gram negativas podem participar de diversos processos biológicos como sobrevivência bacteriana, aquisição de nutrientes, estabelecimento de biofilmes, comunicação celular e patogênese. Apesar da importância dessas vesículas em bactérias patogênicas, pouco ainda é conhecido sobre a formação e ocorrência de VMEs em bactérias de ecossistemas aquáticos. Este trabalho teve por objetivo investigar a ocorrência e formação de VMEs em bactérias cultiváveis de um ecossistema aquático amazônico. Para o estabelecimento de culturas bacterianas, amostras foram coletadas do Rio Negro (AM), submetidas à diluição seriada e semeadas em dois meios de cultura sólidos não seletivos: R2A e TSA. As colônias bacterianas em cultura foram caracterizadas em morfotipos de acordo com seus aspectos macroscópicos e microscópicos (forma, arranjo e composição da parede celular) por microscopia de luz. Os morfotipos foram transferidos para meio líquido (TSB) e a curva de crescimento estabelecida por densidade óptica através de espectrofotometria e densidade bacteriana pela microscopia de fluorescência. O estabelecimento das culturas de bactérias do Rio Negro apontaram que o meio R2A possibilitou o crescimento de mais morfotipos de colônias (10). Análises por microscopia de luz dos morfotipos mostraram uma maior ocorrência de bactérias Gram negativas (58,33%), com predominância de bacilos (51%) e distribuídas isoladamente (58,33%). A curva de densidade em meio líquido (TSB) mostrou-se estável na quarta hora de cultura, indicando o fim da fase exponencial e início da fase estacionária. A microscopia eletrônica de transmissão revelou bactérias de diferentes tamanhos ( $0,93 \mu\text{m}^2$  à  $1.290 \mu\text{m}^2$ ) e envoltório celular com características típicas de espessura e composição dos grupos bacterianos gram-positivo e gram-negativo. Análises quantitativas demonstraram maior ocorrência de bactérias com parede celular tipicamente Gram negativa (77,28%), caracterizada pela presença de membrana plasmática, espaço periplasmático e membrana externa. Paralelamente, além das características morfológicas do envoltório celular bacteriano, foi possível a observação de estruturas bacterianas intra e extracelulares, como cápsula, flagelo, nucleóide, grânulos e septos de divisão e esporulação. A MET revelou a ocorrência de VMEs, brotando da membrana externa de bactérias Gram negativas em direção ao meio extracelular. A maior proporção de VMEs (83%) foi encontrada em processo de formação, aparecendo isoladamente ou formando grupamentos vesiculares aderidos ao envoltório celular. VMEs já completamente formadas, livres no meio extracelular também foram detectadas (17%) distantes ou próximas de grupos de bactérias. Análises morfométricas das VMEs revelaram vesículas de tamanhos variados ( $15 \mu\text{m}$ - $300 \mu\text{m}$  de diâmetro). Porém, as vesículas aderidas às bactérias apresentaram menor diâmetro ( $60,94 \pm 7,32 \mu\text{m}$ ) em comparação com as vesículas livres no meio extracelular ( $149,4 \pm 21,10 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ). Em conjunto, o presente trabalho demonstrou a capacidade de bactérias aquáticas cultiváveis do Rio Negro secretarem VMEs durante o crescimento em cultura. O entendimento de diferentes aspectos morfológicos destas bactérias e a caracterização ultraestrutural das VMEs enfatiza o fato das bactérias de ecossistemas aquáticos constituírem microrganismos estruturalmente organizados, denotando sua complexidade funcional e adaptativa.

## Abstract

Outer membrane vesicles (OMVs) released by Gram negative bacteria play an important role in a variety of biological processes, such as bacterial survival, nutrient acquisition, biofilm establishment, cell communication and pathogenesis. Despite the importance of these vesicles in pathogenic bacteria, the formation and occurrence of OMVs in bacteria of aquatic ecosystems is still poorly understood. The present work aimed to investigate the occurrence and formation of OMVs in cultured bacteria from an Amazonian aquatic ecosystem. For bacterial cultures, samples were collected from Negro River (AM), serially diluted and spread-plate in two non-selective solid culture media: R2A and TSA. Colonies were characterized through macroscopic aspects and microscopic characteristics. Colonies morphotypes were transferred to non-selective liquid media (TSB) and the growth curve was analyzed by optical and cellular density, through spectrophotometry and fluorescence microscopy, respectively. Our results showed that R2A media enabled the growth of most colonies morphotypes (10). Microscopic analyses by light microscopy showed that Gram negative bacteria (58,33%), bacillus shape (51%) and isolate arrangement (58,33%) were predominant among bacterial morphotypes. The density curve showed a growth stabilization around the fourth hour of culture, indicating the end of the exponential phase and the beginning of the stationary phase. Transmission electron microscopy revealed bacteria with different sizes ( $0,93 \mu\text{m}^2$  à  $1.290 \mu\text{m}^2$ ) showing gram-positive and gram-negative envelopes. TEM quantitative analyses showed higher frequency of Gram negative bacteria (77,28%) exhibiting cell envelope composed by plasma membrane, periplasmic space and outer membrane. TEM enabled the visualization of intra and extracellular bacterial structures, such as capsule, flagellum, nucleoid, granules and cellular septa. TEM analyses revealed the occurrence of OMVs extruded from the outer membrane of Gram negative bacteria. The higher OMVs proportion was found in process of budding, appearing isolated or in clusters adhered to cellular envelope. Free OMVs were also detected in the extracellular medium, near or distant from bacterial clusters. Morphometric analyses showed vesicles with various sizes (15  $\mu\text{m}$ -300  $\mu\text{m}$  in diameter). However, vesicles in process of formation showed smaller size than free vesicles in the extracellular medium. Altogether, the present work demonstrated, for the first time, the ability of bacteria from Negro River to generate OMVs during growth in culture media. The ultrastructural characterization of OMVs emphasizes the fact that bacteria from aquatic ecosystems are structurally organized microorganisms denoting its functional and adaptive complexity.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

COD	Carbono orgânico dissolvido
COP	Carbono orgânico particulado
DAPI	4',6 – diamidino-2- fenilindol-dihidrocloro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Gr	Grânulos
LPS	Lipopolissacarídeos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
ME	Membrana externa
MOD	Matéria orgânica dissolvida
O <sub>2</sub>	Oxigênio
RNA	Ácido ribonucleico
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
UFC	Unidade formadora de colônias
UV	Raios ultravioleta
VMEs	Vesículas de membrana externa



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1	BACTÉRIAS AQUÁTICAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS	11
1.2	ULTRAESTRUTURA BACTERIANA	14
1.2.1	VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA	18
1.2.1.1	Biogênese de VMEs	18
1.2.1.2	Conteúdo e Funções das VMEs	20
1.2.1.3	VMEs em bactérias de ecossistemas aquáticos	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>23</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
3.1	ÁREA DE COLETA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	24
3.2	ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS	25
3.2.1	Diluição Seriada das Amostras	25
3.2.2	Meios de Cultura e Semeadura	26
3.2.3	Caracterização Macroscópica das Colônias Bacterianas	27
3.2.4	Isolamento e Conservação	27
3.2.5	Caracterização Microscópica dos Morfotipos Bacterianos	28
3.2.6	Estabelecimento da Curva de Crescimento	28
3.2.6.1	Densidade óptica por espectrofotometria	29

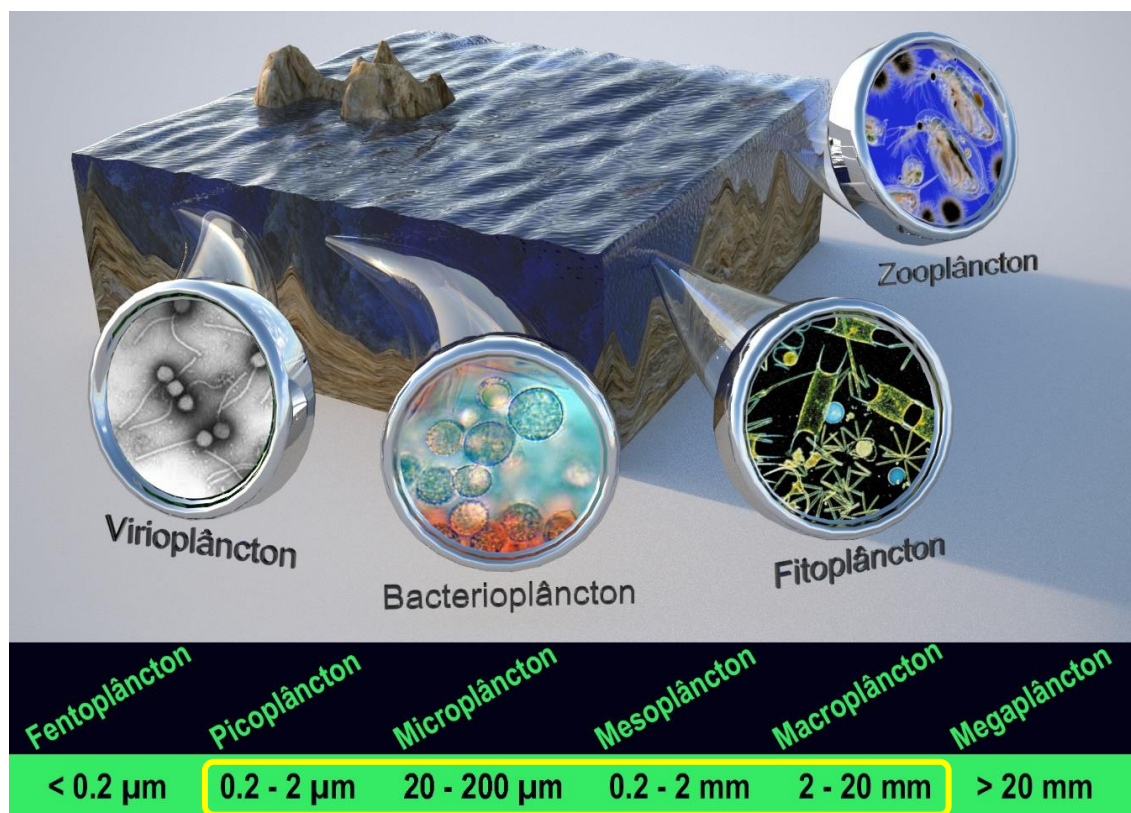
3.2.6.2	Densidade celular por microscopia de fluorescência	29
3.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	30
3.3.1	Processamento das Culturas para MET	30
3.3.2	Análises Morfométricas e Quantitativas	31
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
4.1	ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS	32
4.1.1	Estabelecimento de Culturas Bacterianas do Rio Negro	32
4.1.2	Aspectos Morfológicos das Colônias Bacterianas	32
4.1.3	Estabelecimento da Curva de Crescimento Bacteriano	33
4.1.3.1	Curva de crescimento por densidade óptica e celular	34
4.2	ULTRAESTRUTURA	36
4.2.1	Envoltório Celular e Características Gerais	36
4.3	VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (VMEs)	37
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
5.1	ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS DO RIO NEGRO	47
5.2	ULTRAESTRUTURA	49
5.2.1	Ultraestrutura do Envoltório Celular das Bactérias do Rio Negro	49
5.2.2	Ultraestrutura de VMEs	50
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 BACTÉRIAS AQUÁTICAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As bactérias são um dos seres vivos mais antigos do nosso planeta, sendo encontradas há mais de 3,8 bilhões de anos. São microrganismos procariotos apresentando uma maior abundância nos sistemas aquáticos continentais e marinhos (SIGEE, 2005b). Estão presentes nos mais diversos habitats terrestres e aquáticos, podendo ocorrer em locais com temperaturas elevadas, e até mesmo em situações de ausência de oxigênio, apresentando uma ordem de grandeza de  $10^2$  a  $10^6$  células.  $\text{mL}^{-1}$  (AZAM et al., 1983; SIGEE, 2005a).

Estima-se que a maior parte das bactérias presentes no ambiente aquático, constituindo o bacterioplâncton, apresenta tamanhos que variam de  $0,2\mu\text{m}$  -  $2\mu\text{m}$  (picoplâncton, Fig. 1), podendo ser encontradas algumas menores que  $0,2\mu\text{m}$  (fentoplâncton), ou ainda entre  $2\mu\text{m}$  -  $20\mu\text{m}$  (nanoplâncton).



**Figura 1: Classificação planctônica baseada no nicho ecológico e classe de tamanho.** Adaptado de SOARES et al. (2011).

O bacterioplâncton é um componente de grande importância na cadeia trófica. Estudos pioneiros de AZAM et al. (1983) e POMEROY (1974) demonstraram o

importante potencial de bactérias na ciclagem de matéria em ambientes aquáticos. Posteriormente, esta importância foi atribuída à grande variedade metabólica bacteriana (AMEZAGAMADRID et al., 2003; DE CARVALHO; FERNANDES, 2010; DEL GIORGIO; COLE, 1998; DUCKLOW, 2000; POMERO; DARWIN, 2007).

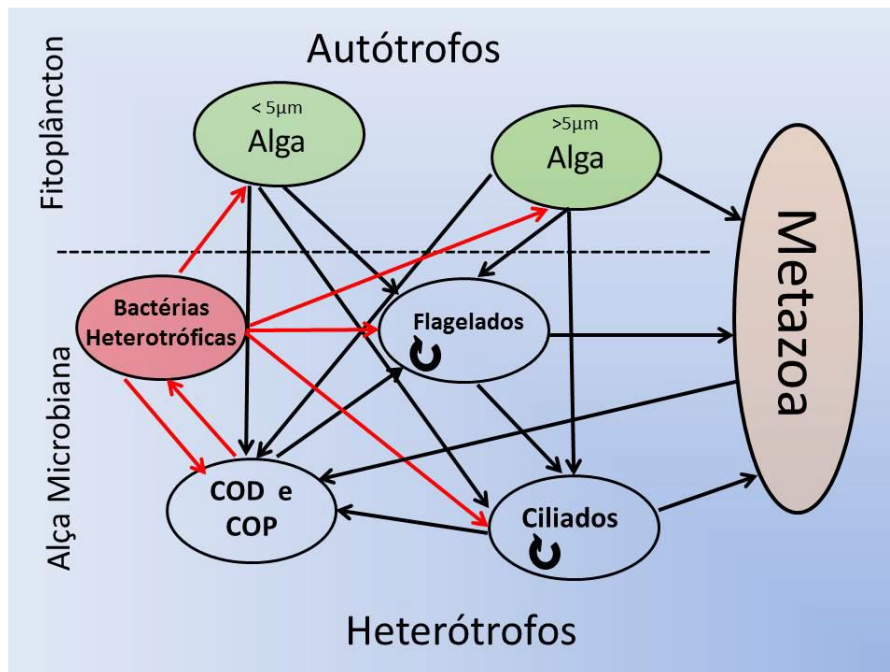
Considerando a obtenção de carbono celular, as bactérias podem ser classificadas metabolicamente como heterotróficas, quando este é obtido pela redução de substâncias orgânicas (KALFF, 2002). As bactérias heterotróficas dependem nutricionalmente da matéria orgânica sintetizada por outros organismos e estão entre os principais grupos de procariotos dos sistemas aquáticos (SIGEE, 2005a). As bactérias também podem ser metabolicamente classificadas em quimiossintetizantes ou fotossintetizantes, quando a matéria orgânica é produzida através da oxidação de carbono.

Um estudo clássico de 1942, desenvolvido por Lindemann, demonstrou o importante papel da comunidade bacteriana na função primária de decomposição de matéria orgânica, e conseqüentemente na ciclagem de nutrientes presentes nos ambientes aquáticos e terrestres, onde as bactérias foram consideradas como os primeiros microrganismos dentro da cadeia trófica microbiana (LINDEMAN, 1942).

Teorias mais recentes apontaram que as bactérias apresentam uma grande importância no mecanismo de consumo do carbono dissolvido (COD), e em sua transformação em matéria orgânica particulada (COP). Desta forma, o carbono antes inacessível à alguns organismos heterotróficos, passa a ser reintroduzido nas teias alimentares. Assim, propuseram a existência de diversos níveis tróficos, denominado “elo microbiano” ou “alça microbiana”, termos utilizados para designar a cadeia alimentar que inclui as bactérias e seus principais predadores (AZAM et al., 1983; POMERO; DARWIN, 2007; SIGEE, 2005b).

O conhecimento desta alça demonstrou o papel das bactérias na absorção e recuperação da matéria orgânica dissolvida e na transferência para níveis superiores, tendo uma grande importância na ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos, assim como também sendo uma importante via de fluxo de energia.

De acordo com SHERR; SHERR (1988), existem tantos elos diretos entre algas e microrganismos heterotróficos, que o elo microbiano não pode ser separado do resto da teia alimentar microbiana. Uma representação mais explicativa das teias microbianas e sua relação com os níveis tróficos superiores (Fig. 2).



**Figura 2: Esquema da Alça Microbiana.** Adaptado de SHERR; SHERR (1988) por Gamalier, J.P. As setas destacadas em vermelho mostram a íntima e necessária relação na transferência de carbono entre o nível trófico bacteriano e outros níveis superiores.

Diversos fatores bióticos e abióticos podem interferir na abundância e na produção da comunidade bacteriana. Segundo COVENEY; WETZEL (1988), as concentrações de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, em alguns sistemas aquáticos, parecem limitar a abundância e a atividade bacteriana. Isto ocorre quando as bactérias utilizam matéria orgânica pobre nesses nutrientes, ou mesmo formas inorgânicas destes, necessitando recorrer a fontes adicionais na coluna d'água.

Não só a disponibilidade de nutrientes, como também outros fatores como: temperatura, radiação ultravioleta, relações com outros organismos e predação por bacteriófagos (DEL GIORGIO; COLE, 1998; FUHRMAN; AZAM, 1980; FUHRMAN; NOBLE, 1995; GROSSART, 2010), podem desencadear a lise celular, promovendo uma posterior liberação de componentes ricos em carbono, fósforo e nitrogênio à outras bactérias. O equilíbrio entre todos esses fatores proporciona uma boa manutenção da comunidade bacteriana no ambiente aquático.

O bacterioplâncton é bastante susceptível a mudanças físico-químicas do ambiente em que se encontra, gerando a necessidade de rápida adaptação fisiológica, quando presente em locais onde ocorrem grandes variações em curtos espaços de tempo. Essas adaptações permitem que a comunidade bacteriana suporte períodos de redução de matéria orgânica e energia (GROSSART, 2010).

## 1.2 ULTRAESTRUTURA BACTERIANA

Em decorrência dos avanços na qualidade das técnicas em microscopia eletrônica, nas décadas de 50 e 60, a ultraestrutura bacteriana começou a ser melhor estudada, possibilitando uma análise mais precisa da organização bacteriana. Desta forma, as bactérias foram observadas como células com um elevado nível de organização e com estruturas bem definidas (HOPPERT; MAYER, 1999).

De uma forma geral, as bactérias possuem uma membrana plasmática e parede celular que delimitam o citoplasma, onde se pode observar uma variedade de estruturas, tais como ribossomos, mesossomos, nucleóides e alguns grânulos. São células típicas que contêm cerca de 70% do seu peso em água. A maior parte desta água é encontrada no citoplasma, que serve como solvente para a solução concentrada de íons, proteínas, ácidos nucleicos, precursores metabólicos, e outras pequenas moléculas, sendo envolvido por uma bicamada lipídica (unidade de membrana) (BENSON, SPENCER A, 1998). No citoplasma também é encontrado uma diversidade de grânulos citoplasmáticos, chamados de inclusões citoplasmáticas. A natureza química destas estruturas varia entre as bactérias, mas a sua função é quase sempre de reserva de substâncias e de subunidades de macromoléculas para compor outras estruturas celulares, mas também auxiliam na pressão osmótica, uma vez que suas moléculas ficam em sua forma particulada (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Corpúsculos lipídicos bacterianos observados no citoplasma, apresentam-se como gotas arredondadas, formadas por um núcleo hidrofóbico de polifosfatos, delimitadas por uma monocamada de fosfolipídios e proteínas distintas (fasinas). Estes desempenham papéis importantes no metabolismo de lipídeos (MURPHY, 2001).

O DNA bacteriano é encontrado em uma região irregular citoplasmática denominada nucleóide. Esta região é preenchida por fitas dupla-hélice de ácido

desoxirribonucleico (DNA) na forma de uma única molécula desdobrada. Na maioria dos grupos bacterianos o DNA não se encontra delimitado por envoltório nuclear, não forma aparelho mitótico, e encontra-se em contato com a membrana plasmática ou mesossomos. Ainda existem, no citoplasma bacteriano, em números variados, moléculas circulares de DNA, chamadas plasmídeos, onde seus genes não determinam características essenciais, mas muitas vezes conferem vantagens seletivas às bactérias que os possuem (PRESCOTT, L. M.; HARLEY; DONALD, 2002).

Além destas estruturas citoplasmáticas, algumas bactérias podem apresentar flagelos, e camadas capsulares externas à parede celular (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Vários procaríotos sintetizam uma gama de substâncias poliméricas extracelulares compostas de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, lipídeos e outras macromoléculas biológicas, chamadas de cápsula. A cápsula é depositada na superfície da célula e fica ligada à parede celular, sendo importante reservatório de água e nutrientes, uma vez que são formadas por macromoléculas muito hidratadas, protegendo contra dessecação do meio (WINGENDER; NEU; FLEMMING, 1999).

Estruturas capsulares, membrana plasmática e parede celular formam a estrutura conhecida como envoltório celular, que protege e permite a adaptação das bactérias nos mais diferentes meios (WINGENDER et al., 1999).

A membrana plasmática bacteriana é composta por proteínas (60%) e lipídeos (40%), sendo os fosfolipídios os mais importantes (PRESCOTT, L. M. et al., 2002). Quando observada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), a membrana apresenta-se com aspecto trilaminar idêntico ao das células eucariotas, sendo constituída por uma bicamada lipídica de lipídeos assimétricos com uma extremidade polar e outra apolar, além de possuir proteínas periféricas ou integrais. A membrana plasmática tem funções importantes na manutenção energética das células, pela transdução de sinais e outros processos mediados que produzem energia, na homeostase celular (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995), na excreção de substâncias, na síntese de lipídeos, na duplicação de DNA (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004), na divisão celular e na formação de mesossomos (PRESCOTT, L. M. et al., 2002). Com vários processos vitais acontecendo na membrana plasmática, a perda de sua integridade é irreversível, denotando inviabilidade ou morte celular.

Em grande parte das bactérias, a parede celular deve a sua rigidez e força a uma camada composta de uma substância somente encontrada em procariotos, denominada de mureína, mucopetideo ou peptideoglicano (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Hans Christian Gram distinguiu, em 1884, duas grandes classes de bactérias denominadas gram-positivas e gram-negativas, baseados na retenção do corante cristal de violeta. Com o desenvolvimento da microscopia eletrônica e técnicas bioquímicas da análise dos componentes celular, foi verificado que este fato se deve à diferença na composição de estrutura da parede celular (Fig. 3) (BENSON, S.A., 1998).

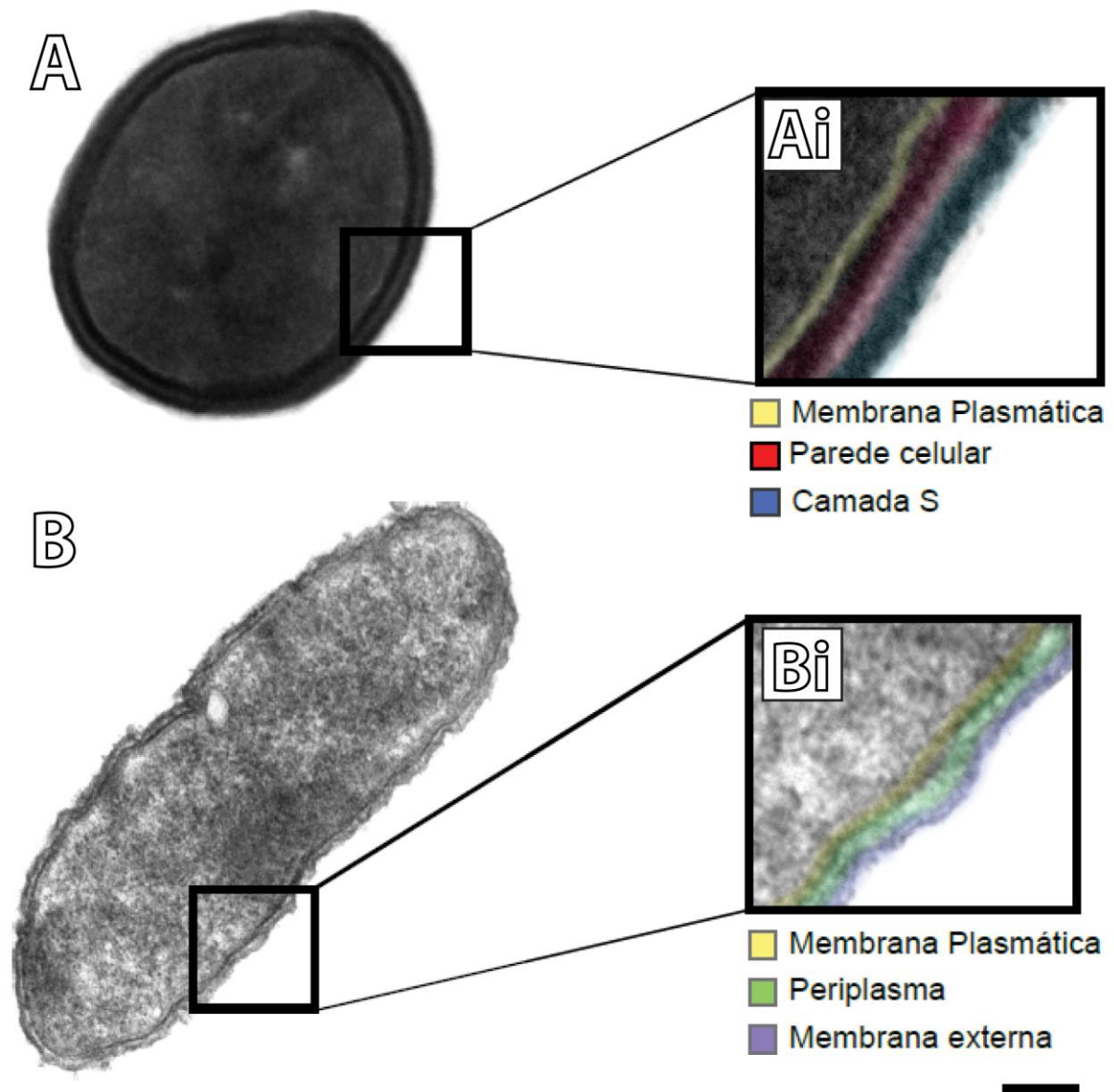
Bactérias gram-positivas (Fig. 3) apresentam parede celular espessa (20 a 80nm), composta de peptideoglicano (cerca de 75%) organizado em uma ou mais camadas, proteínas e ácidos tecoicos. Ácidos tecoicos incluem todos os polímeros formados por resíduos de glicerol e ribitol, e são divididos em dois tipos, aqueles ligados ao peptideoglicano e aqueles intimamente ligados aos lipídeos da membrana plasmática, chamados de ácidos lipotecóicos. Os esporos bacteriano, ou endósporo, são estruturas formadas por algumas espécies de bactérias gram-positivas, quando o meio se torna carente de água ou de nutrientes essenciais. Essa diferenciação celular ocorre em situações desfavoráveis do meio, e podem sobreviver a condições extremas, como altas temperaturas, ausência de água, radiações e substâncias tóxicas (BENSON, SPENCER A, 1998; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Já a parede das bactérias gram-negativas é formada por uma ou poucas camadas de peptideoglicano e por uma membrana externa, separadas pelo espaço periplasmático (ocupado pelo periplasma, Fig.3). O peptideoglicano de bactérias gram-negativas, em menor concentração quando comparado a bactérias gram-positivas, possui ligações peptídicas entre diferentes aminoácidos (PRESCOTT, L. M. et al., 2002).

A membrana externa de bactérias gram-negativas (Fig. 3), assim como a membrana plasmática, é formada por uma bicamada lipídica, sendo a camada interna composta basicamente por fosfolipídios, e a externa por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas (SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S., 2010). Os lipopolissacarídeos são responsáveis pelas características antigênicas de algumas bactérias, sendo chamados de endotoxinas (BENSON, SPENCER A, 1998). As diversas proteínas constituintes da membrana externa são responsáveis pela formação dos poros para passagem de solutos (porinas e proteínas da membrana



externa) e pela estruturação desta membrana (lipoproteínas) (FLETCHER et al., 2009). A membrana externa pode produzir vesículas que são secretadas ao meio exterior sendo chamadas de vesículas de membrana externa (VMEs) (CHATTERJEE; CHAUDHURI, 2012).



**Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias aquáticas cultivadas mostrando diferentes tipos de envoltórios celulares.** (A) Bactéria com envoltório celular típico de bactérias gram-positivas. Em (Ai), observa-se, em maior aumento, detalhes da membrana plasmática (amarelo) e parede celular (vermelho). Note em (Ai), que o envoltório celular apresenta uma estrutura bidimensional externa a parede celular (azul, camada S). Em (B), uma imagem representativa de bactéria gram-negativa. (Bi) mostra o envoltório celular Gram negativo composto por

membrana plasmática (amarelo), periplasma (verde) e membrana externa (lilás). Barra, A=160nm; Ai=360nm; B=200nm e Bi=560nm.

### 1.2.1 VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA

Nos últimos anos, a liberação extracelular de vesículas a partir da membrana de células procarióticas tornou-se objeto de grande interesse. Estas vesículas de nano-escala (20-300nm) são formadas a partir da membrana externa (ME) de bactérias e por esta razão, são conhecidas como VMEs (BILLER et al., 2014).

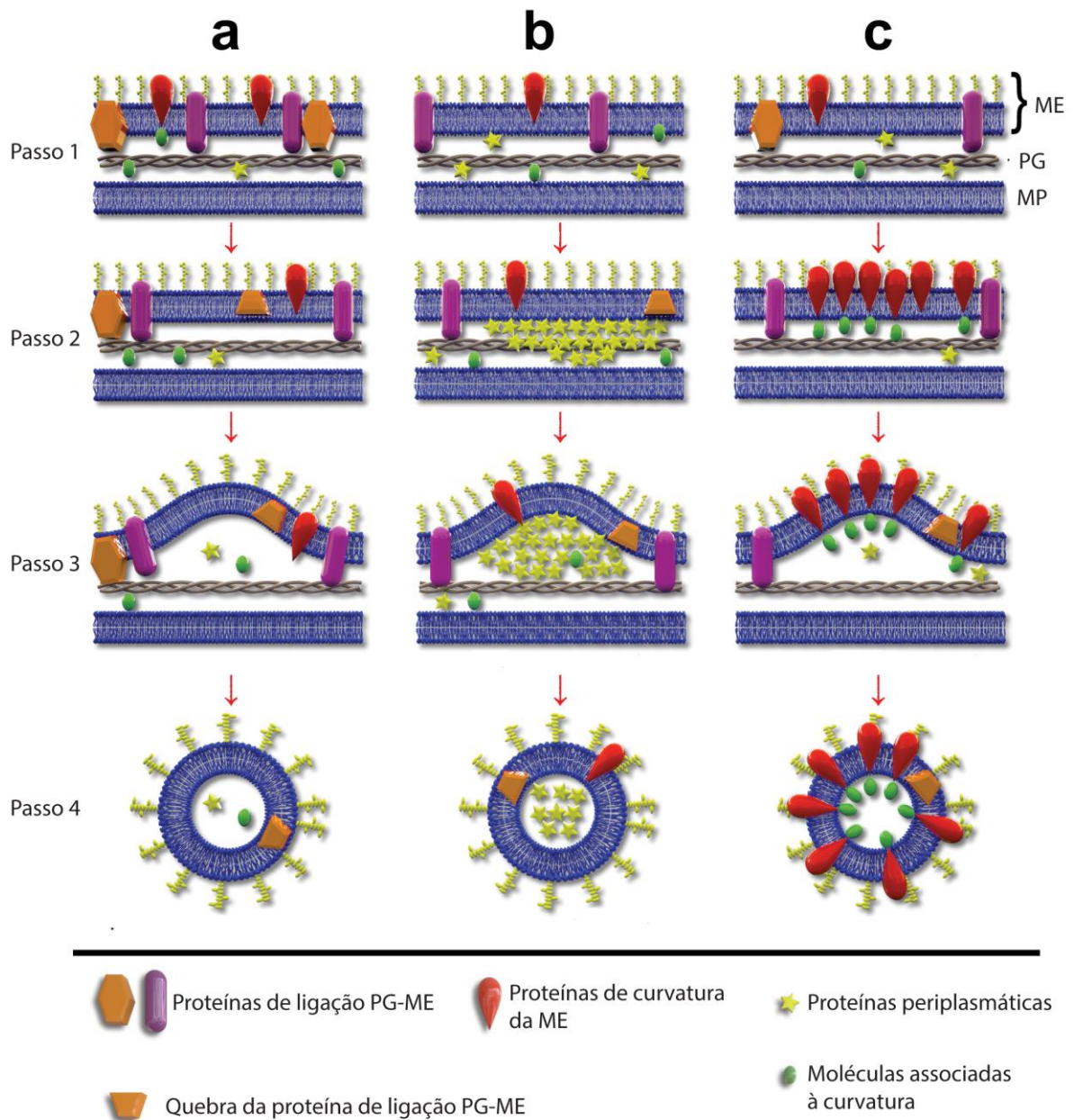
VMEs têm sido associados com processos biológicos variados que se assemelham aos utilizados por organismos superiores como: patogênese, defesa celular, comunicação celular e transferência de DNA (RIVERA et al., 2010).

#### 1.2.1.1 Biogênese de VMEs

A biogênese de VMEs tem sido reconhecida como um processo essencial, bem regulado e conservado evolutivamente, já que células eucarióticas também são capazes de produzir vesículas extracelulares a partir de sua membrana plasmática (GOULD; GARG; MARTIN, 2016).

Diversos modelos tem sido propostos para biogênese de VMEs em bactérias patogênicas. Em geral, o primeiro passo para a formação das VMEs é a formação de uma protusão da membrana em poucas ou muitas regiões da ME. Isto requer: (1) produção em quantidades elevadas de componentes da ME para evitar a ruptura nestes locais, (2) alterações locais da composição e ligações moleculares relacionadas a ME e ao peptidoglicano no periplasma, (3) suprimento energético necessário para a formação de evaginação da ME e (4) estímulo celular para a formação desta evaginação (CHATTERJEE; CHAUDHURI, 2012; KULP; KUEHN, 2010). No ponto de formação das evaginações foi proposto que existe o envolvimento de proteínas de curvatura da membrana externa. O contínuo crescimento da ME, com o acúmulo de materiais no periplasma e a ausência de forças de ligação entre ME e peptidoglicano, levam ao crescimento da evaginação com consequente formação de uma projeção arredondada proeminente, que se desprende da ME em direção ao meio extracelular originando uma vesícula de ME (HAURAT; ELHENAWY; FELDMAN, 2015; KULP; KUEHN, 2010). Os três

mecanismos clássicos propostos para a biogênese de VMEs são mostrados na figura 5.



**Figura 5: Mecanismos propostos para a biogênese de VMEs em bactérias patogênicas.** Passo 1: envoltório bacteriano mostrando distribuição de proteínas, incluindo proteínas de ligação peptidoglicano-membrana externa (PG-ME) que não levam ao desligamento do peptidoglicano. Passo 2 e 3: estágio inicial de vesiculação. Em várias áreas, as ligações entre peptidoglicano e membrana externa são perdidas pelo movimento das proteínas de ligação (PG-ME) ou pela quebra da ligação diretamente. Isto pode ser suficiente para uma produção basal de VMEs (coluna a). O aumento da concentração de proteínas periplasmáticas (coluna b) ou o acúmulo de proteínas de curvatura da membrana externa (coluna c) podem induzir eventos de brotamento. Passo 4: Liberação de VMEs. VMEs que formam

sem a força de indução (coluna a) podem não ter conteúdo não particularmente enriquecido. Quando as VMEs são formadas pela pressão da membrana externa provocada pelo acúmulo de proteínas pode haver enriquecimento do conteúdo vesicular (coluna b). Caso proteínas e outras moléculas associadas à curvatura estejam envolvidas então o conteúdo também será enriquecido (coluna C). Em todas as situações, as proteínas de ligação PG-ME inativas ou clivadas podem estar presentes durante a formação de VMEs. Estes mecanismos de brotamento não são excludentes, mas as VMEs liberadas em cultura podem ser de uma população mista e podem ter conteúdo enriquecido difícil de detectar. Adaptado de KULP; KUEHN (2010).

#### 1.2.1.2 Conteúdo e Funções das VMEs

As VMEs são capazes de estocar e transportar um amplo repertório de conteúdo do citoplasma e periplasma bacteriano (CHATTERJEE; CHAUDHURI, 2012). Desta forma, o transporte extracelular por vesículas representam um relevante sistema de tráfego de sinalização em bactérias (KULP; KUEHN, 2010).

Diferentes compostos podem ser encontrados nas VMES dependendo da espécie/cepa e condições experimentais. Por exemplo, na bactéria patogênica *Borrelia burgdorferi*, VMEs podem carregar lipídios que irão atuar na modulação de respostas imunes no hospedeiro (CROWLEY et al., 2013). Moléculas de sinalização quórum-sense transportadas por VMEs podem atuar como um sistema de comunicação célula-célula, aumentando a eficiência da resposta de uma população (MASHBURN; WHITELEY, 2005). Algumas enzimas associadas a virulência também podem ser encontradas em VMEs, elevando a capacidade de infecção das bactérias (MASHBURN; WHITELEY, 2005).

Em situações de competição por nicho, autolisinas e quinolinas antibacterianas podem ser empacotadas nas VMEs sendo endereçadas à lise de outras bactérias (KULP; KUEHN, 2010). Em bactérias formadoras de biofilme, as VMEs podem conter moléculas que vão auxiliar no estabelecimento e expansão do biofilme (KULP; KUEHN, 2010; YONEZAWA et al., 2009). A produção de VMEs pode também funcionar como um sistema de entrega de DNA atuando na transferência horizontal de genes entre as células da mesma população ou em diferentes população em uma comunidade bacteriana (PÉREZ-CRUZ et al., 2013; RUMBO et al., 2011).

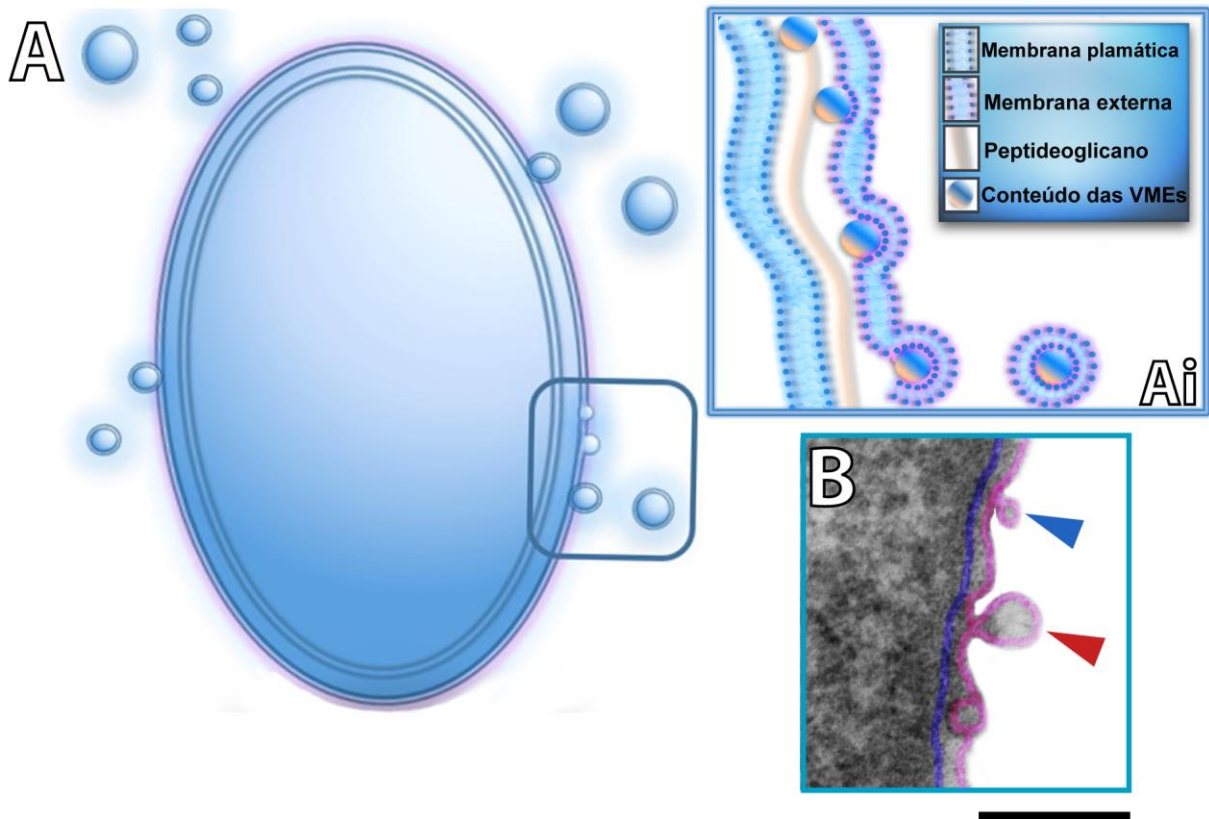
Interessantemente, proteínas mal formadas podem ser acumuladas durante um estresse sendo exportadas para aliviar o dano (MCBROOM; KUEHN, 2007). E também, podem atuar na resistência a infecção por bacteriófagos. Estes fatos demonstram que a produção de VMEs podem compor um mecanismo protetivo para evitar o acúmulo de proteínas mal formadas potencialmente tóxicas ao contexto celular ou prevenir a lise por infecção viral (KULP; KUEHN, 2010; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015).

#### 1.2.1.3 VMEs em bactérias de ecossistemas aquáticos de água doce

O conhecimento atual sobre a biogênese de VMEs e seus supostos papéis em bactérias são principalmente baseados em diferentes modelos de espécies bacterianas patogênicas (HAURAT et al., 2015; KULP; KUEHN, 2010). Porém, muito pouco é conhecido sobre a capacidade de liberação de VMEs por bactérias de ecossistemas aquáticos. Neste contexto, pouco se sabe sobre a abundância e potenciais funções destas vesículas extracelulares na biologia e ecologia aquática.

Em comunidades bacterianas marinhas, vesículas derivadas de bactérias foram documentadas como abundantes em amostras de sistemas costeiros e mar aberto. Este intenso tráfego vesicular observado pode estar diretamente relacionado com o fluxo de carbono nos ecossistemas marinhos (BILLER et al., 2014).

O grupo de Biologia Celular/UFJF tem desenvolvido trabalhos acerca da ocorrência e produção de vesículas extracelulares de bactérias em ecossistemas aquáticos de água doce, *in situ* e *in vitro* (Fig. 6). Recentemente, foi visualizada pela primeira vez a ocorrência e formação de VMEs em bactérias de água doce no seu sistema natural (SILVA, T. P. et al., 2014) e em culturas (GAMALIER et al., 2016). Estudos ultraestruturais identificaram vesículas sendo produzidas a partir da membrana externa no meio natural e em meio de cultura (Fig. 6) (SILVA, THIAGO P; GAMALIER; MELO, 2016). Também foi relatado um aumento da produção de VMEs por bactérias em situação de estresse ambiental, em resposta à radiação ultravioleta (GAMALIER et al., 2016). Estas observações são indicativas da ocorrência de um processo de secreção ativo e caracterizado por VMEs em ecossistemas aquáticos.



**Figura 6: Formação e liberação de vesículas de membrana externa (VMEs) em uma bactéria de ecossistema aquático.** Representação esquemática da estrutura do envoltório celular e biogênese das VMEs de uma bactéria Gram negativa típica. Na eletromicrografia, a membrana plasmática e membrana externa encontram-se destacadas em azul e rosa, respectivamente. A seta azul indica a primeira projeção da ME, enquanto a vermelha a VME formada. Barra de escala = 650 nm. Retirada de GAMALIER et al. (2016).

Assim, as VMEs podem ser importante rota de transporte e troca de informações entre a comunidade bacteriana, tornando forte ferramenta nas adversidades encontradas no meio. Desta forma, o presente trabalho teve como principal foco, o estudo primário da VMEs.

## 2. OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência e formação de VMEs em bactérias cultiváveis de um ecossistema aquático amazônico.

## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

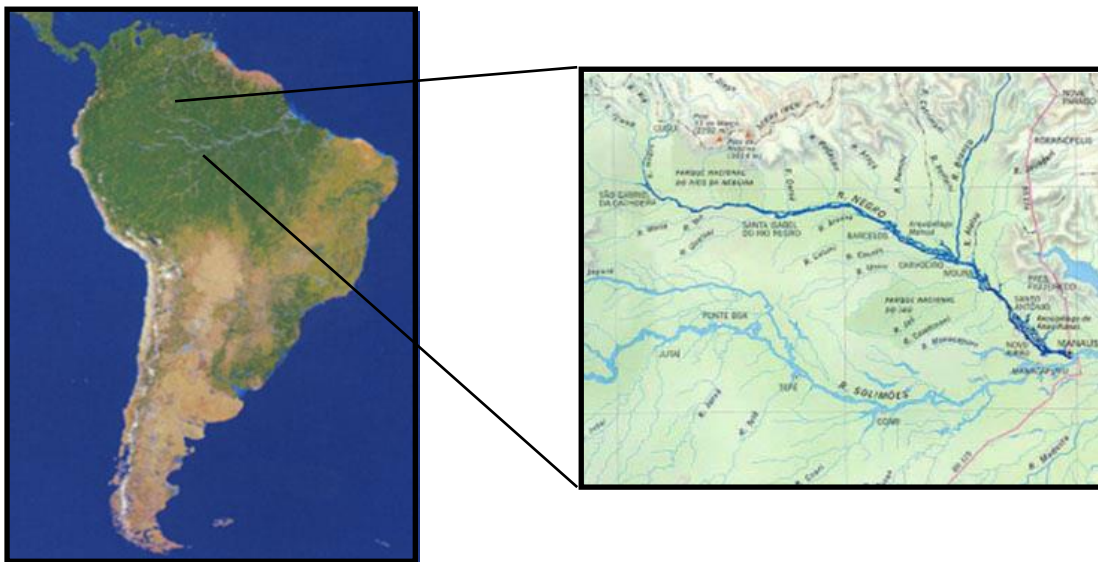
- Estabelecer uma cultura de bactérias do Rio Negro (AM) no Laboratório de Biologia Celular na Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais;
- Caracterizar os morfotipos de colônia de acordo com seus aspectos microscópicos (forma e arranjo celular) através do método de Gram;
- Avaliar a ultraestrutura do envoltório celular de bactérias cultiváveis do Rio Negro por MET;
- Avaliar o processo de formação de vesículas de membrana externa em bactérias com envoltório gram-negativo por MET;
- Aplicar técnicas morfométricas para caracterização ultraestrutural de VMEs bacterianas;
- Contribuir para o entendimento da complexidade estrutural e o processo de formação de vesículas de membrana externa em bactérias de ecossistemas aquáticos.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 ÁREA DE COLETA E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

O rio Negro é o maior afluente da margem esquerda do rio Amazonas, na Amazônia, na América do Sul. Além do mais extenso rio de água preta do mundo, é o segundo maior em volume de água. Tem sua origem entre as bacias do rio

Orinoco e Amazônica. Drena a região leste dos Andes na Colômbia. Após passar por Manaus, une-se ao rio Solimões e, a partir dessa união, este último passa a chamar-se rio Amazonas. O clima desta região é tropical úmido. A pluviosidade na bacia do Rio Negro varia de 3500 a 2137 mm por ano. A temperatura média da região varia 24 à 32°C. A vegetação da região é de floresta predominantemente tropical (FRANZINELLI; IGREJA, 2002).



**Figura 7: Localização Geográfica do Rio Negro.** O Rio Negro se localiza na região norte do país, fazendo parte da Bacia do Rio Amazonas.

O nome " Negro " vem da cor da sua água, provocada pela grande quantidade de ácidos húmicos dissolvidos (ácidos e óxidos de ferro; e mercúrio), dando também a sua água pH ácido característico (MORTATTI; VICTÓRIA; TARDY, 2011). Os ácidos húmicos são provenientes de materiais orgânicos, tais como raízes, folhas e madeira que se decompõem lentamente na água. De acordo com SIOLI (1991), a origem da água preta está em grande parte relacionada com o podzólico da área de cabeceira. Neste tipo de solo, o material orgânico é submetido a rápida decomposição ao húmus, que é facilmente dissolvido pela percolação da água da chuva e transportado para o lençol freático, que finalmente emerge na superfície do rio.

Durante a estação de chuvas, o nível de água elevado facilita o desenvolvimento de uma alta quantidade de biodiversidade. Já durante a estação de seca, o com a variação no nível da água gera um decréscimo na biodiversidade devido a fatores hidrogequímicos (MOREIRA-TURCQ et al., 2003).



Amostras de água foram coletadas da sub-superfície (0,5 m de profundidade) do rio, armazenadas imediatamente sob refrigeração a 5° C e levadas ao laboratório para o estabelecimento das culturas bacterianas.

### 3.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS

Apenas uma fração de toda a comunidade bacteriana de um ecossistema aquático é cultivável em condições laboratoriais controladas. As bactérias cultiváveis são definidas como a fração de todas as células capazes de crescimento laboratorial em meios artificiais (BERNARD et al., 2000). Desta forma, visando uma maior diversidade de bactérias aquáticas de água doce foram realizados diferentes procedimentos seguindo padrão estabelecido no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

#### 3.2.1 Diluição Seriada das Amostras

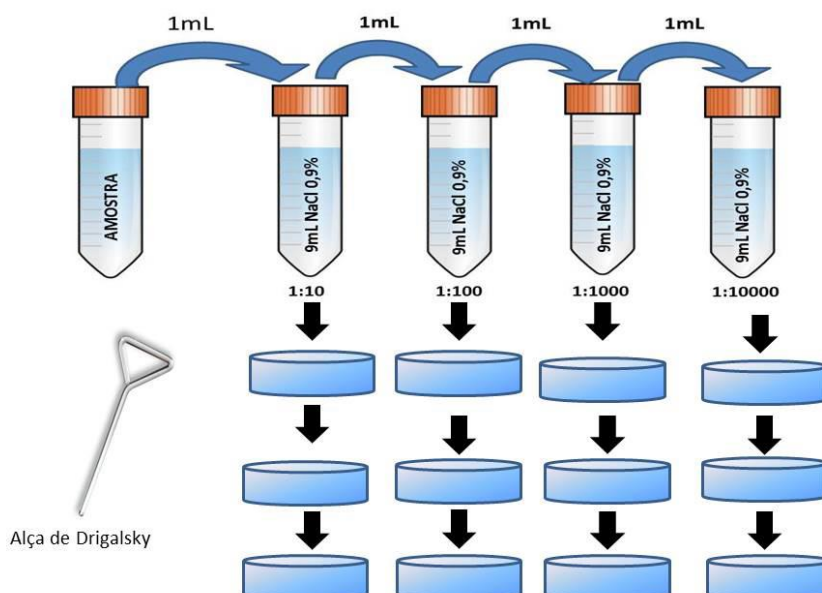
Para o estabelecimento das culturas bacterianas em laboratório, amostras do Rio Negro foram inicialmente submetidas a um processo de diluição seriada, que consiste em diminuir a concentração de bactérias, permitindo crescimento amplo da diversidade de bactérias cultiváveis. Em capela de fluxo laminar, foi diluída uma alíquota de 1mL da amostra em 9mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Da mesma maneira, foram realizadas 4 diluições subseqüente na escala de 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 (Fig. 8).

#### 3.2.2 Meios de Cultura e Semeadura

Com o propósito de crescimento de um maior número possível de espécies bacterianas presentes na amostra, foram utilizados meios de cultura não seletivos sólidos: TSA (Tryptic soy agar, Bacto®, BD, USA) e R2A (Himedia®); e meio não seletivo líquido: o TSB (Tryptic soy broth, Bacto®, BD, USA). O TSA é um meio de cultura bacteriano rico em nutrientes (triptona, peptona, carboidratos, proteínas e lipídios, BioCen, Campinas, SP, Brasil). Enquanto o R2A apresenta possui baixa

concentração de nutrientes, sendo um meio alternativo usado para contagem de placas heterotróficas e para isolar subculturas de água potável. Já o TSB é um meio rico em nutrientes, de propósito geral usado para o cultivo de uma ampla variedade de microrganismos e testes de esterilidade de bactérias.

Alíquota de 100µL de cada diluição obtida a partir da diluição seriada, através da técnica de semeadura “spread-plate” ou por distensão, sob fluxo laminar, foi transferida para o meio sólido, homogeneizada com auxílio de uma alça de Drigalsky previamente esterilizada (Fig. 8). As culturas foram incubadas em posição invertida à temperatura ótima de 28°C por 72 horas em uma estufa de cultura bacteriológica (Gamalier, 2013). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.



**Figura 8: Esquema de inoculação de alíquotas de diferentes diluições seriadas a partir da amostra em meio de cultura sólido, adaptado de Gamalier, J.P. (2013).**

### 3.2.3 Caracterização Macroscópica das Colônias Bacterianas

Ao término do período de incubação, colônias foram quantificadas e classificadas de acordo com suas características, como: coloração, formato da borda, elevação, detalhe óptico, tamanho e textura da colônia segundo “*Manual of Microbiological Methods*” (CONN, 1957). E chamadas de morfotipos.

### 3.2.4 Isolamento e Conservação

Após a caracterização macroscópica dos morfotipos, foi realizado o isolamento de cada colônia. Com o auxílio de um alça de platina previamente esterilizada, uma porção de cada morfotipo foi pinçada selecionada e transferida para uma placa de Petri contendo o mesmo meio de cultivo através da técnica de semeadura por estrias múltiplas. As placas foram incubadas nas mesmas condições utilizadas no processo de semeadura. Cada morfotipo visualizado como organismo distinto recebeu uma identificação. Ao término do período de incubação, foi verificado o crescimento e/ou a ausência de morfotipos diferentes daquele inoculado. Este procedimento foi repetido três vezes ou até que se obtivesse uma colônia pura, ou seja, sem a presença de outros morfotipos (contaminação).

Após o processo de purificação, os morfotipos foram preparados de forma a compor uma coleção de isolados viáveis para utilização de posteriores estudo do grupo. Uma pequena porção da colônia purificada foi pinçada e, por técnica de estriação simples, adicionada ao meio inclinado (45°) e mantido em uma estufa bacteriológica a 28°C até que fosse verificado o crescimento de colônias. Com a finalidade de elaborar uma coleção desses isolados por longo período, o morfotipo purificado foi pinçado com auxílio da alça de platina previamente esterilizada e transferido para um meio de cultura líquido não seletivo, TSB. Após 12 horas de incubação em estufa bacteriológica a 28°C, sob fluxo laminar, 1mL da cultura líquida foi diluído em 9mL de meio TSB esterilizado. Foram adicionados 300µL de glicerol em 700µL desta diluição, e armazenados à temperatura de -80°C em ultrafreezer.

### 3.2.5 Caracterização Microscópica dos Morfotipos Bacterianos

Após o isolamento, as colônias bacterianas foram pinçadas e realizados esfregaços em lâminas. Em seguida, foi realizada a coloração das bactérias através do método de Gram. A coloração de Gram é uma técnica de coloração de bactérias desenvolvida pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram (1884). O mecanismo da coloração de Gram baseada na composição da parede celular bacteriana. As bactérias Gram positivas possuem sua parede celular composta por uma espessa camada de peptidoglicano e ácidos tecóicos, que quando submetidas à técnica de Gram, tornam-se desidratadas pelo álcool, acarretando a diminuição de

sua porosidade (permeabilidade), impedindo a saída do complexo cristal de violeta-lugol. Já as bactérias Gram-Negativas tem parede celular composta por fosfolipídeos e lipopolissacarídeos que durante o processo de coloração são extraídos pelo álcool, resultando no aumento da permeabilidade que permite a remoção do complexo cristal de violeta-lugol. Através desta técnica foi possível a separação de bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas, e a determinação de sua forma e arranjo.

Os esfregaços bacterianos em lâmina foram fixados na chama do bico de Bunsen (10 s), de modo que o material não se desprendesse durante o processo de coloração. Os esfregaços foram corados com a solução de cristal de violeta (violeta de metila - 1 min), diafanizados em lugol, desidratados com álcool (95°GL) e contra corados com fucsina básica. Entre as etapas, as lâminas foram lavadas com água destilada. As lâminas coradas foram analisadas ao microscópio de luz (Olympus, BX-41), e as bactérias foram caracterizadas quanto à forma, arranjo e retenção do corante cristal de violeta.

### 3.2.6 Estabelecimento da Curva de Crescimento

O crescimento bacteriano possui fases com características determinadas, como a fase de (1) latência ou lag, (2) exponencial ou log, (3) estacionária e (4) declínio ou morte (PRESCOTT, L.; HARLEY; KLEIN, 1996; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Os morfotipos das colônias isolados foram pinçados e inoculados em um mesmo meio de cultura líquido não seletivo, TSB, buscando uma maior representatividade da comunidade bacteriana do sistema. Após a inoculação, o meio foi incubado por 12hs, em estufa bacteriológica, a uma temperatura ótima de crescimento de 28°C. Depois deste período, foi estabelecida a curva de crescimento por densidade óptica e densidade celular conforme descrito abaixo.

#### 3.2.6.1 Densidade óptica por espectrofotometria

Alíquotas de 2mL, em capela de fluxo laminar, foram utilizadas para medição da massa celular em espectrofotômetro através da leitura da densidade óptica no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600nm (DU@640 Spectrophotometer, Beckman Coulter). Essa etapa foi realizada repetidamente a cada uma hora. O meio

TSB estéril foi utilizado durante o experimento, como controle, para zerar o espectrofotômetro nos momentos de avaliação da densidade óptica. Para a montagem da curva de densidade óptica por mL de meio de cultura, foram utilizados os valores de menor diluição que possibilitavam sua leitura.

#### 3.2.6.2 Densidade celular por microscopia de fluorescência

Para a análise da densidade bacteriana por microscopia de fluorescência, amostras foram fixadas em formaldeído 2% e coradas DAPI na concentração final 5µg/mL (SILVA, T.P. et al., 2013). As lâminas foram preparadas por citocentrifugação (Shandon cytopsin 4, Thermo Electron) a 452x g por 10 min em alta aceleração (SILVA, T. P. et al., 2014), e as bactérias contadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-60) em 10 campos aleatórios, em aumento de 1000x. Para a quantificação bacteriana foi utilizado o seguinte fator de conversão:  $(nxA)/(Vxa)$ , onde: n= número de células contadas, a= área da grade contada, A= área total; e V= (volume fixado de amostra x volume contado)/ (volume da amostra) + (volume do fixador).

### 3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

#### 3.3.1 Processamento das Culturas para MET

As amostras da cultura líquida das bactérias do Rio Negro foram coletadas e imediatamente fixadas, ainda em suspensão, em solução de Karnovsky (1% paraformaldeído e 1% de glutaraldeído) durante 1 h, conforme protocolo de rotina do Laboratório de Biologia Celular da UFJF (BARROS; AL, 2010). Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, e centrifugadas (254 x g a 15°C por 20 minutos) para obtenção de pellets.

Em seguida, foram incluídos em ágar 2%, o que possibilitou que as etapas subsequentes fossem realizadas sem o contato direto com os organismos. Esta pré-inclusão em ágar reduz os artefatos causados por danos mecânicos e a perda de espécimes durante os procedimentos que se seguem (MELO et al., 2007). Os blocos de ágar contendo as amostras foram pós fixados em ósmio reduzido (ferrocianeto de potássio 3% em tampão fosfato 0.2M e ósmio 2% em água destilada) por 1h em temperatura ambiente e lavados por 3 vezes em tampão fosfato 0,1M, pH7,3. Após a lavagem com tampão maleato de sódio, pH 5,2, as amostras foram contrastadas *in bloc* com acetato de uranila 2% em tampão maleato de sódio (0,05 M, pH 6,0) por 2 horas à temperatura ambiente e lavadas com a mesma solução tampão. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etapas de concentrações crescentes de álcoois (50%, 70%, 90%, 95%), passando em cada etapa duas vezes por 5 minutos e, posteriormente em acetona (5 minutos). Após a desidratação, as amostras foram pré-infiltradas em meio de inclusão epon/acetona (2:1) overnight à temperatura ambiente, infiltradas em meio com DPM-30 e incluídas em resina (Polybed 812, Polysciences, Warrington, PA, USA). Após polimerização por 16 horas à 60°C, foram feitos cortes ultrafinos em ultramicrotomo (Sorval MT2, newton, MA, USA), os quais foram contrastados com citrato de chumbo. As amostras foram analisadas em diferentes aumentos em microscópio eletrônico de transmissão (EM-10, Zeiss, USA) em 60 KV, na Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

### 3.3.2 Análises Morfométricas e Quantitativas

Para as análises ultraestruturais, foi estudado um total de 58 micrografias, em aumentos de 15000x a 200000x. Para as avaliações morfométricas das bactérias e das VMEs nas micrografias obtidas por MET foi utilizado o programa Image J (National Institute of Mental Health, USA). Os seguintes parâmetros foram estudados:

- Características gerais da ultraestrutura bacteriana: a ocorrência das principais estruturas bacterianas, como nucleóide, cápsula e grânulos.
- Envoltório celular: foi analisada a composição do envoltório celular das bactérias, e estas foram classificadas tipicamente gram-positivo

(membrana plasmática e parede celular) ou gram-negativo (membrana plasmática, periplasma e membrana externa).

- Vesículas de membrana externa: foram quantificadas e foi estabelecido o número por secção celular; categorizadas em (i) aderidas, quando apresentavam íntimo contato com a membrana externa e (ii) livres, quando apresentavam afastadas da células ou sem contato direto com a membrana externa; medidos os diâmetros.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados da avaliação quantitativa entre VMEs aderidas e livres, e diâmetro das vesículas foram comparados usando test t Student ( $P < 0,05$ ). Análises e gráficos estatísticos foram realizados usando o software GraphPrism 6.0.1 (software GraphPad, San Diego, CA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS

#### 4.1.1 Estabelecimento de Culturas Bacterianas do Rio Negro

Após a coleta na sub-superfície do Rio Negro, amostras foram diluídas seriadamente ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) e as culturas de bactérias estabelecidas em dois meios de cultura sólidos não seletivos: R2A e TSA. Em ambos os meios utilizados, foi verificado o crescimento de colônias bacterianas que apresentaram aspectos morfológicos e microscópicos diferenciados conforme apresentado a seguir. No meio R2A, o crescimento de colônias foi observado em todas as

diluições, enquanto no meio TSA, detectou-se crescimento apenas na diluição  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ .

#### 4.1.2 Aspectos Morfológicos das Colônias Bacterianas

Os diferentes aspectos morfológicos colônias bacterianas nas diferentes diluições e nos meios de cultura R2A e TSA foram classificados de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas em morfotipos (CONN, 1957). Foram encontrados nos dois meios um total de 13 diferentes morfotipos de colônia. No meio R2A, o crescimento de colônias recuperou uma maior diversidade de morfotipos (10 morfotipos, Quadro 1).

Para análise das características microscópicas, as colônias foram analisadas ao microscópio de luz após coloração de Gram. A técnica de coloração de Gram é baseada na retenção do cristal de violeta e reflete a composição da parede celular bacteriana. Foram encontradas bactérias Gram positivas e Gram negativas entre os diferentes morfotipos. Porém, a maior proporção das bactérias foi Gram negativas (58,33%). Além disso, foi encontrada uma diversidade de características microscópicas em relação à forma e ao arranjo celular. A forma celular predominante entre os morfotipos foi de bacilos (50%) e a maioria das bactérias não apresentou arranjo celular, sendo encontradas isoladas (58,33%), conforme mostrado no quadro 1. Após isolamento, os morfotipos bacterianos foram conservados à  $-80^{\circ}\text{C}$  em ultrafreezer no Laboratório de Biologia Celular/UFJF.



**Quadro 1: Características microscópicas e crescimento nos diferentes meios de cultura (R2A e TSA) dos morfotipos bacterianos encontrados nas culturas de bactérias do Rio Negro.** São apresentadas características morfológicas de forma e arranjo celular, assim como a classificação de acordo com a retenção do corante cristal de violeta segundo método de Gram. Cada morfotipo encontrado foi nomeado seguindo o padrão RNM e numeração.

Morfotipos	Características Microscópicas			Crescimento em meio de cultura	
	Forma celular	Arranjo	Gram	TSA	R2A
RNM1	cocos	diplococos	positivas	sim	sim
RNM2	bacilos	diplobacilos/isolados	negativas	sim	sim
RNM3	bacilos	estreptobacilos/isolados	positivas	sim	não
RNM4	bacilos	diplobacilos/isolados	negativas	sim	sim
RNM5	cocos	sarcina	negativas	sim	não
RNM6	espirilo	isolados	negativas	sim	sim
RNM7	bacilo	diplobacilos	positivas	sim	sim
RNM8	alongada	isolados	positivas	sim	não
RNM9	cocos	estreptococos/isolados	positivas	não	sim
RNM10	bacilo	isolados	positivas	não	sim
RNM11	bacilo	isolados	negativas	não	sim
RNM12	bacilo	diplobacilo	negativas	não	sim
RNM13	cocos	tétrade	negativas	não	sim

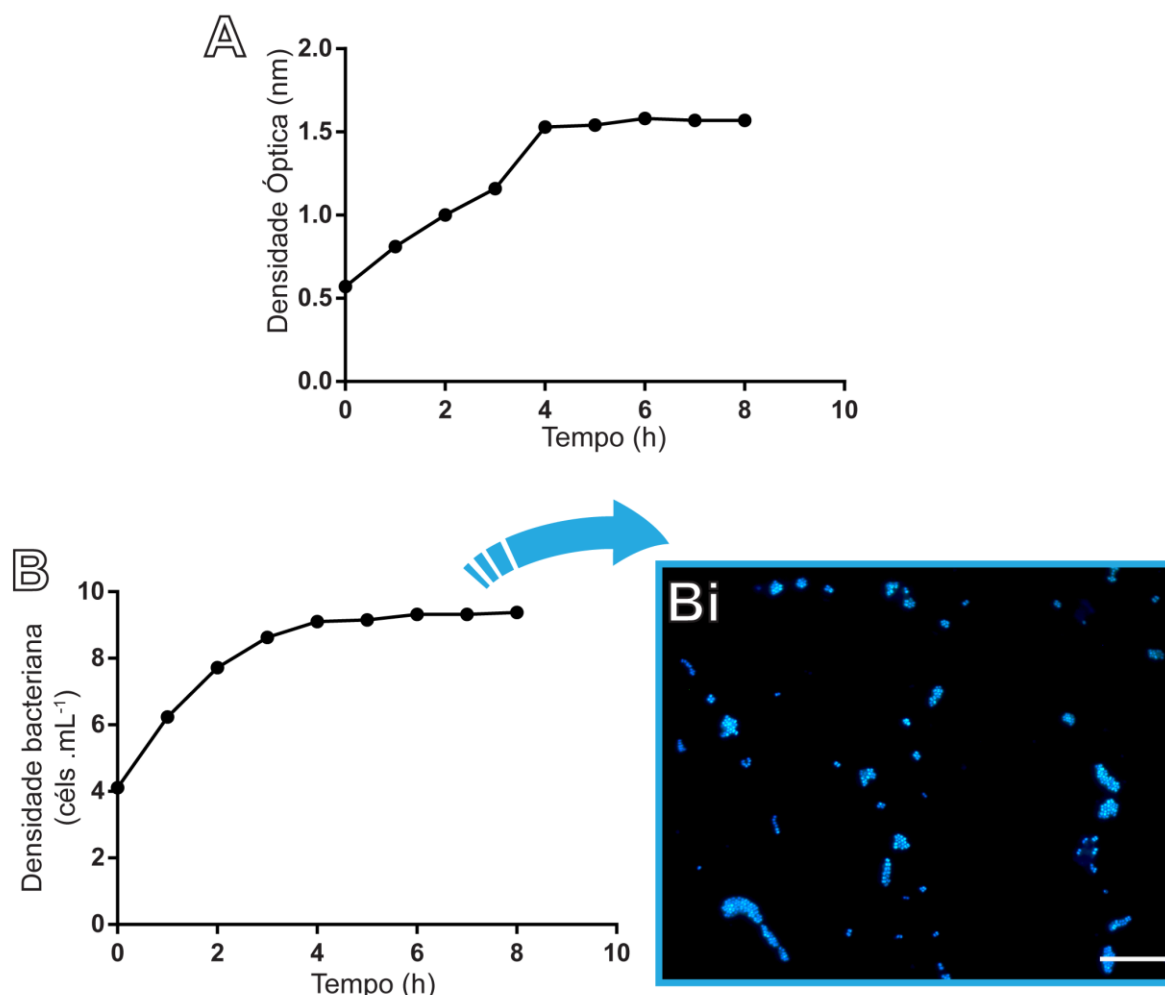
#### 4.1.3 Estabelecimento da Curva de Crescimento Bacteriano

Depois do isolamento dos morfotipos caracterizados em meio sólido, as colônias bacterianas foram transferidas para meio de cultura líquido não seletivo (TSB) e incubados por 12 horas, conforme descrito na seção 3.2.4. Logo após, foi realizada a análise do comportamento da curva de crescimento bacteriano por 8 h e foram estabelecidas as fases exponencial e estacionária.

#### 4.1.3.1 Curva de crescimento por densidade óptica e celular

Para o estabelecimento da curva de crescimento na cultura líquida, foi realizada a análise de absorvância obtida pela densidade óptica (Fig. 9A). E após coloração com DAPI, foi analisada a densidade celular por quantificação das bactérias por microscopia de fluorescência (Fig. 9B e Bi).

Em ambas as análises, foram observadas que a curva de densidade assumiu imediato crescimento constante da densidade marcando o início da fase exponencial. Na quarta hora a curva mostrou-se estável, portanto, indicando o fim da fase exponencial e início da fase estacionária. Na fase estacionária a taxa de crescimento e morte bacteriano se equilibram, tornando constante o número de células (PRESCOTT, L. M. et al., 2002; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).



**Figura 9: Curva de crescimento das bactérias do Rio Negro em meio de cultura TSB à 28°C por densidade óptica (A) e densidade celular (B). Em (A e B), note que em ambas as análises houve uma estabilização do crescimento bacteriano em**

torno da quarta hora. A densidade óptica foi estabelecida por espectrofotometria (600nm) do meio de cultura inoculado e a densidade celular estabelecida pela contagem de bactérias em microscopia de fluorescência após coloração com DAPI (Bi). Barra= 10 µm.

## 4.2 ULTRAESTRUTURA

### 4.2.1 Envoltório Celular e Características Gerais

Um aspecto marcante da ultraestrutura bacteriana é o envoltório celular que está envolvido com funções fisiológicas importantes, como reações bioquímicas do metabolismo e comunicação celular (KLEANTHOUS; ARMITAGE, 2015). As análises ultraestruturais revelaram bactérias de diferentes tamanhos (0,93 µm<sup>2</sup> à 1.290 µm<sup>2</sup>, Fig. 10A) com envoltório celular apresentando diferentes espessuras e composição refletindo características típicas dos grupos bacterianos gram-positivo e gram-negativo (Fig. 10A, B e C).

Análises quantitativas revelaram maior ocorrência de bactérias com parede celular tipicamente gram-negativa (77,28%), caracterizada pela presença de membrana plasmática, espaço periplasmático e membrana externa (Fig. 10A e B). As bactérias com envoltório gram-positivo mostraram membrana plasmática, parede celular de peptidoglicano e camada S compondo o envoltório celular (22,72%, Fig. 10A e C).

A maior proporção das células com envoltório gram-negativo (85,71%) apresentou estruturas capsulares formadas por matriz extracelular de exopolímeros com espessura média de 45,33±18,82 µm (Media ±EP), variando entre 0,500µm - 0,160 µm.

Outro aspecto ultraestrutural marcante relacionado com o envoltório celular observado apenas nas bactérias Gram negativas foi a ocorrência de vesículas brotando da membrana externa. Estas estruturas serão descritas a seguir.

Paralelamente, além das características morfológicas do envoltório celular bacteriano, foi possível a observação de estruturas bacterianas intra e extracelulares típicas, como flagelo (Fig. 11A), nucleóide (Fig. 11B) e grânulos (Fig. 11B). Além disso, foi possível a visualização de septos celulares (Fig. 11C) associados à divisão celular ou esporulação (ROTHFIELD; TAGHBALOUT; SHIH, 2005), na região mediana ou distal da célula, respectivamente.

### 4.3 VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (VMEs)

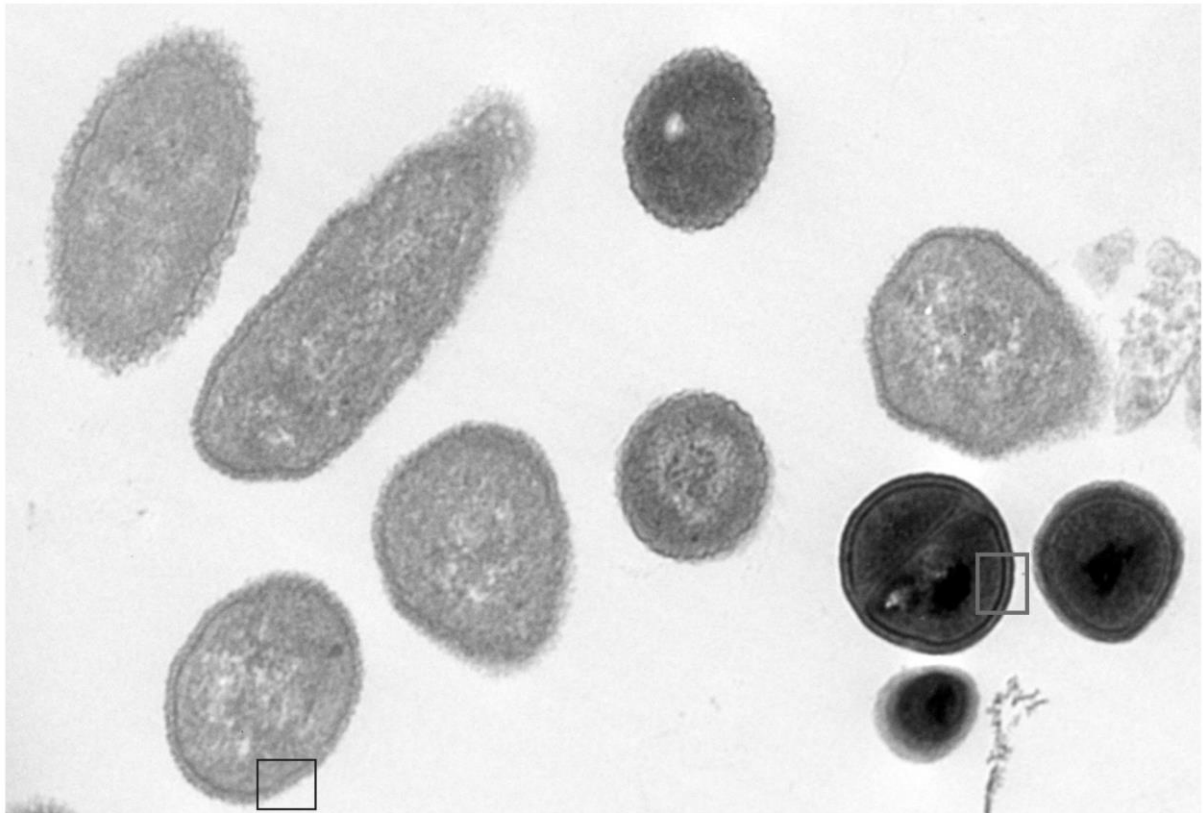
Para estudar a ultraestrutura e o processo de formação das vesículas VMEs, foram feitas análises morfométricas e quantitativas destas estruturas em 35 eletromicrografias de bactérias gram-negativas.

Parte das secções bacterianas apresentou VMEs (51,43%). Um total de 61 VMEs foram analisadas e contadas por MET. As VMEs foram claramente identificadas como estruturas arredondadas delimitadas por membrana, com aspecto trimilaminar, similar as vesículas descritas produzidas por outras espécies bacterianas (BEVERIDGE, 1999; KULP; KUEHN, 2010; TASHIRO; UCHIYAMA; NOMURA, 2012). Estas vesículas se projetavam a partir da membrana externa do envoltório celular (Fig. 12A e B) em direção ao meio extracelular (Fig. 12C).

Análises quantitativas por MET mostraram que a maior proporção de VMEs (83%) foram encontradas em processo de formação aderidas ao envoltório celular (Fig. 12A e B). As VMEs em formação apareceram isoladamente (Fig. 13A e Ai, setas pretas) ou formando grupamentos vesiculares aderidos ao envoltório celular (Fig. 13A e Ai, setas azuis). Inclusive, foram observadas áreas com intensa produção de vesículas na superfície de algumas bactérias (Fig. 13). VMEs já completamente formadas e livres no meio extracelular também foram detectadas (17%, Fig. 14). Essas apareceram distantes (Fig. 14A) ou próximas de grupos de bactérias (Fig. 14B).

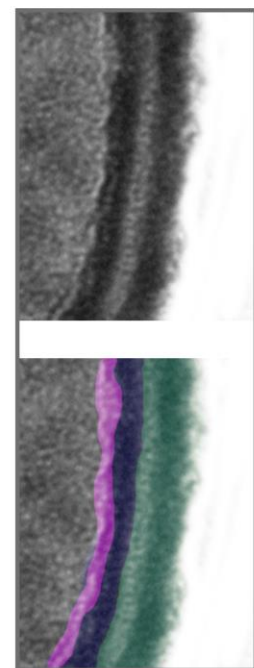
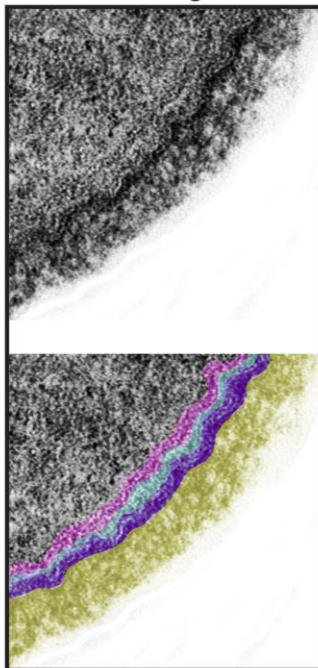
Análises morfométricas das VMEs revelaram vesículas de tamanhos variados medindo entre 15  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$  de diâmetro ( $72,93 \pm 7,94 \mu\text{m}$ , média  $\pm$  EP, Fig. 15A). As vesículas aderidas às bactérias apresentaram menor diâmetro ( $60,94 \pm 7,32 \mu\text{m}$ , média  $\pm$  EP) em comparação com as vesículas livres no meio extracelular ( $149,4 \pm 21,10 \mu\text{m}$ , média  $\pm$  EP,  $p < 0,0001$ , Fig. 15A).

As análises de intervalos de diâmetro das VMEs mostraram que, em geral, grande proporção das vesículas apresentou-se em categorias de menor diâmetro (Fig. 15B). Considerando separadamente VMEs aderidas e livres, as vesículas aderidas apresentaram-se mais concentradas nas categorias de menor diâmetro, enquanto as vesículas livres foram encontradas em maior proporção nas categorias de maior diâmetro (Fig. 15C).



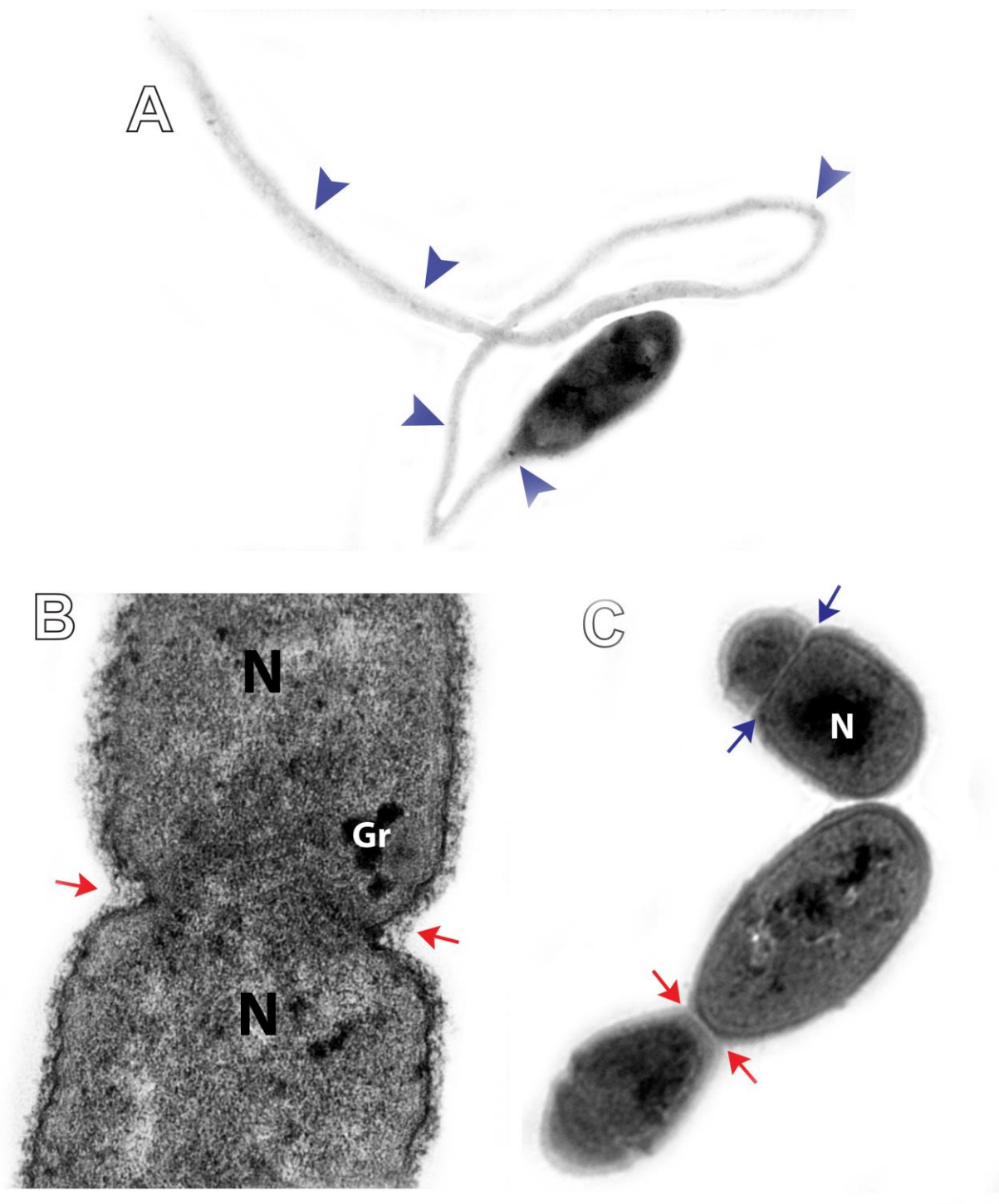
**Gram Negativa**

**Gram Positiva**

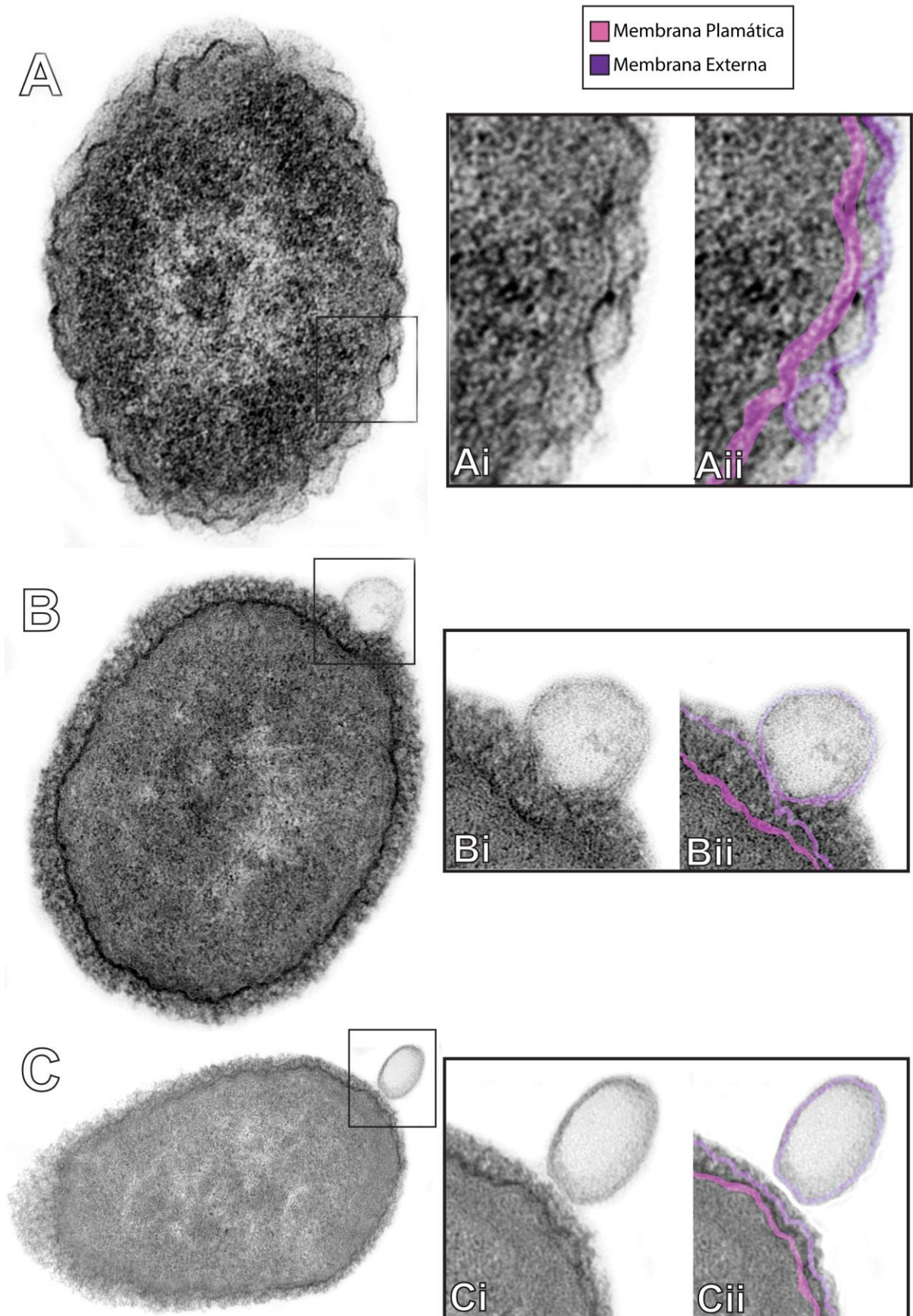


Composição envoltório celular	
<span style="color: pink;">■</span>	Membrana Plasmática
<span style="color: purple;">■</span>	Espaço periplasmático
<span style="color: blue;">■</span>	Parede celular de peptidoglicano
<span style="color: green;">■</span>	Camada S
<span style="color: yellow;">■</span>	Capsula

**Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando bactérias com diferentes tamanhos e tipos de envoltório celular.** Observe nos detalhes, diferentes composições do envoltório celular. À esquerda envoltório celular típico gram negativo composto por membrana plasmática, espaço periplasmático, membrana externa e cápsula, e à direita envoltório celular Gram positivo apresentando membrana plasmática, parede celular e camada S. barra= 450  $\mu$ m, 70 nm (detalhe a esquerda), 90 nm (detalhes a direita).



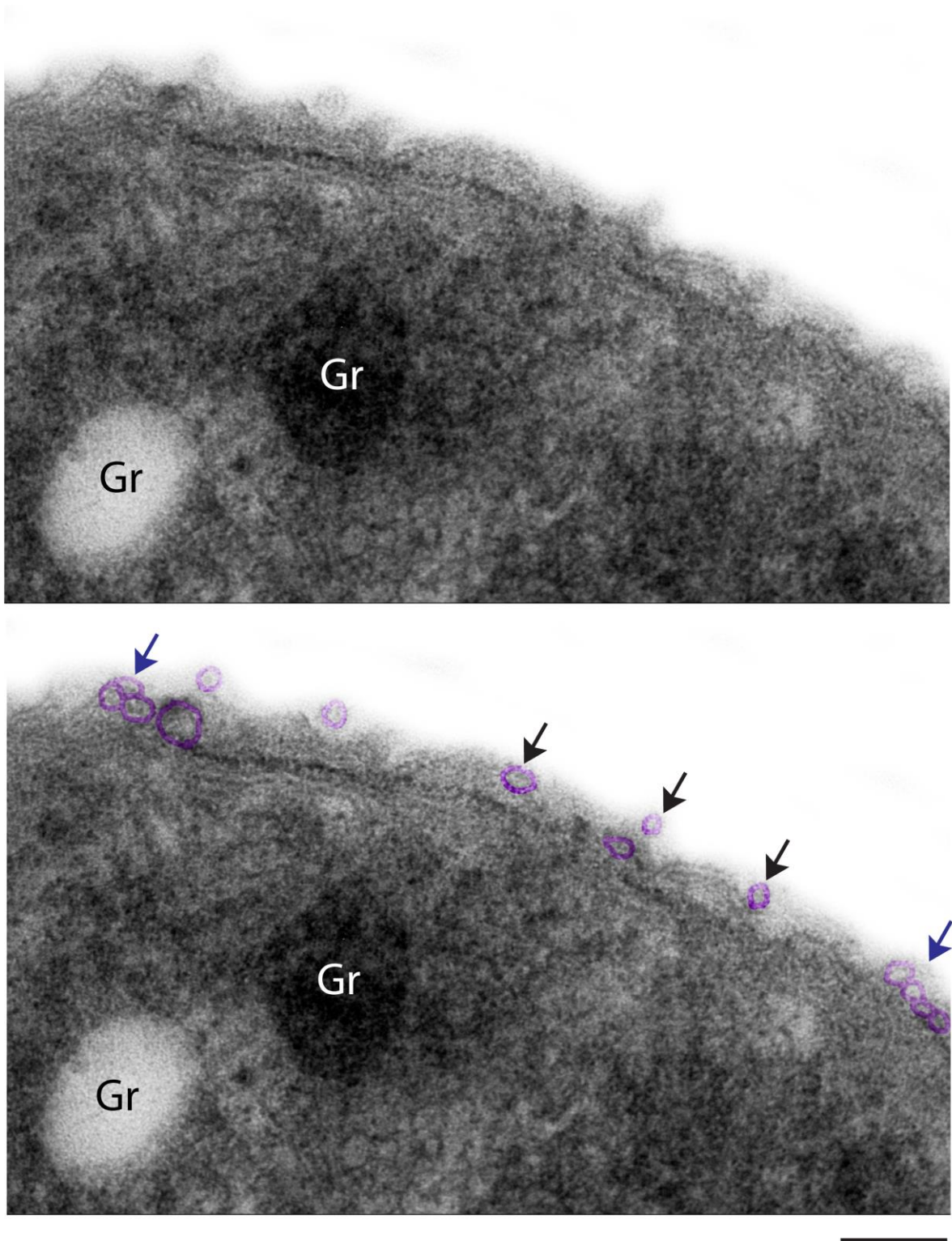
**Figura 11: Ultraestrutura de bactérias cultiváveis do Rio Negro.** Em (A) observe bactéria apresentando flagelo (cabeça de seta). Em (B e C) bactérias apresentando septos celulares simétricos (setas vermelhas) associados a divisão celular e assimétricos relacionados com esporulação (C, setas azuis). Em (B) região de nucleóide (N) e grânulos (Gr). Barra= 400 nm (A), 90 nm (B), 300 nm (C).



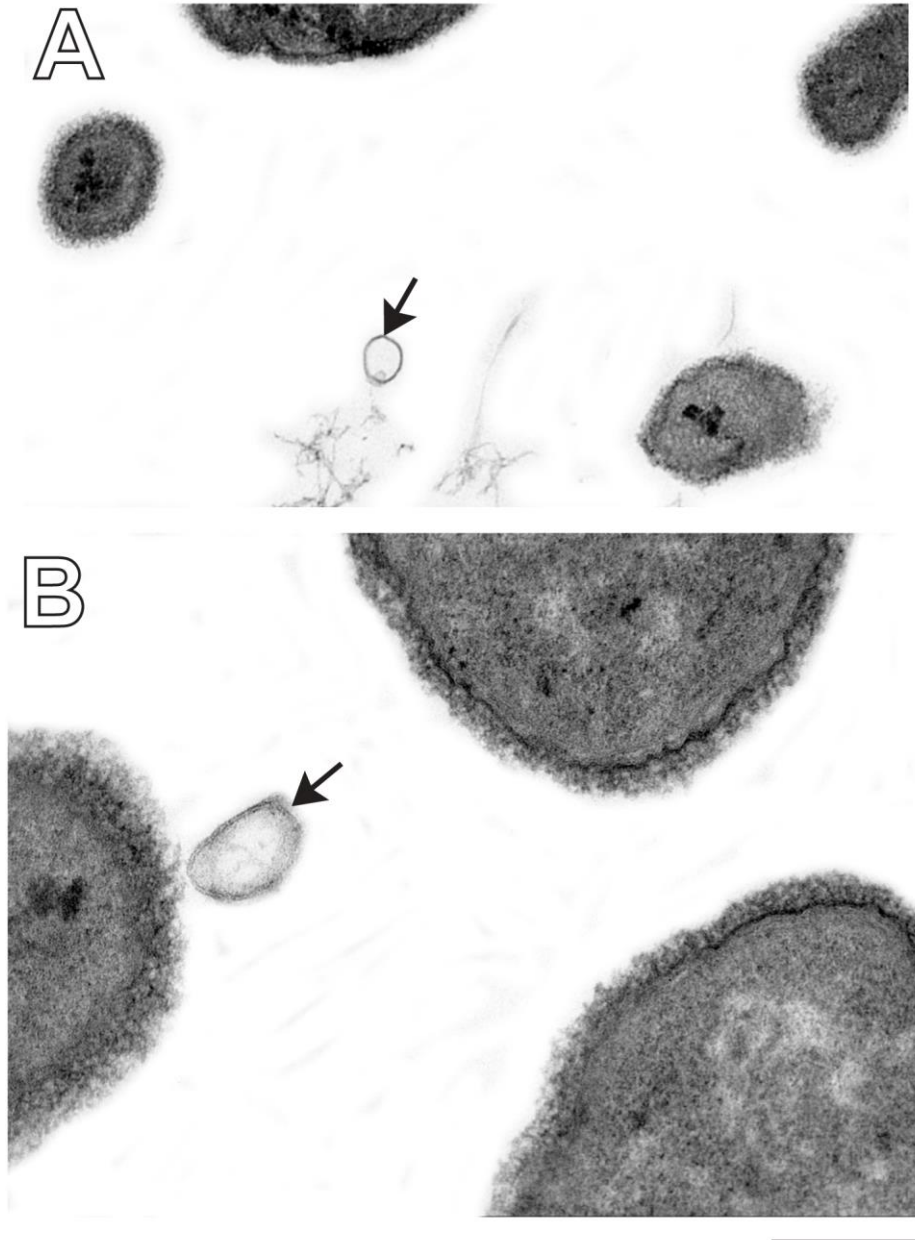
**Figura 12: Produção de vesículas de membrana externa em bactérias gram negativas do Rio Negro vista por microscopia eletrônica de transmissão.**

Note que as vesículas se projetam a partir da membrana externa do envoltório celular (A e B) em direção ao meio extracelular (C). Em (Ai, Aii) e (Bii), observe vesículas em formação aderidas a o envoltório celular. Já (C, Ci), mostra uma vesícula já completamente formada próximo a bactéria que potencialmente a produziu. Barra = 450 nm (A, B), 400 nm (C), 190 nm (Ci), 140 nm (Ai, Aii, Bi,Bi).

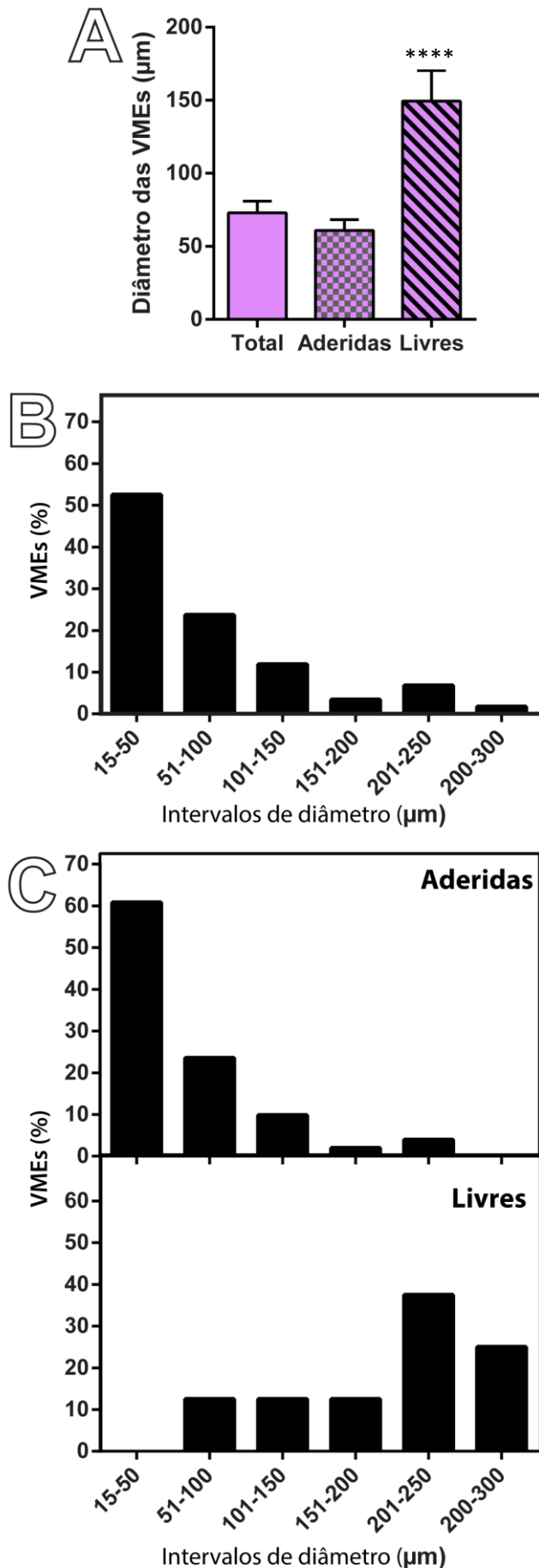




**Figura 13: Periferia de uma célula bacteriana do Rio Negro mostrando área da superfície celular com intensa vesiculação.** Observe que as vesículas em formação aparecem isoladamente (setas pretas) ou em grupamentos vesiculares (setas azuis) aderidos ao envoltório celular da bactéria. Note grânulos citoplasmáticos (Gr) com diferentes eletrondensidades. Barra= 60 nm.



**Figura 14: Vesículas extracelulares livres no meio extracelular.** Note em (A e B) que vesículas delimitadas por membrana com aspecto trilaminar (setas) aparecem completamente formadas no meio extracelular, distantes (A) ou próximas (B) de grupos de bactérias. Barra= 500 nm (A) e 200 nm (B).



**Figura 15: Análises morfométricas do diâmetro das vesículas de membrana externa.** Em (A) gráfico apresentando média do diâmetro das vesículas livres, aderidas e no total. Em (B e C) observe proporção de vesículas nas categorias de intervalo de diâmetro, considerando todas as VMEs (B) ou aderidas e livres separadamente (C). Um total de 61 vesículas foram contadas e medidas em 35 eletromicrografias. As análises morfométricas foram realizadas com auxílio do software Image j. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS DO RIO NEGRO

No ecossistema natural, as bactérias estão submetidas a diversos fatores que atuam em conjunto como temperatura, disponibilidade de nutrientes, predação, competição, infecção viral (AZAM et al., 1983; FUHRMAN; NOBLE, 1995; GROSSART, 2010; POMEROY; WIEBE, 2001). Portanto, para maior compreensão de efeitos isolados de cada fator sobre a comunidade bacteriana são necessários estudos em ambientes experimentais controlados. Assim, o estabelecimento de culturas bacterianas se torna importante para a determinação de protocolos de estudo da fisiologia, biologia e ecologia bacteriana.

No presente estudo, foram estabelecidas culturas de bactérias aquáticas heterotróficas de água doce através do isolamento em dois meios de cultura sólidos não seletivos: TSA e R2A. Foi visualizada a ocorrência de crescimento de colônias nos dois meios utilizados. Estas colônias foram categorizadas de acordo com seus aspectos morfológicos e microscópicos. Assim, foi verificado que o meio R2A apresentou uma maior diversidade de morfotipos de colônia quando comparado ao meio TSA, provavelmente em decorrência da diferença de concentração de nutrientes encontrada nos dois meios. O meio R2A é muito mais pobre em nutrientes que o meio TSA. Portanto, o maior crescimento de colônias no meio R2A sugere que as bactérias aquáticas podem se adaptar mais facilmente a meios pobres, uma vez que o ambiente natural é também um meio com baixa concentração de nutrientes (APHA., 1976). Bactérias das amostras da água quando plaqueadas em um meio mais rico como TSA sofrem possivelmente um choque de nutrientes que limita seu crescimento. Inclusive, o meio R2A é recomendado para crescimento de bactérias heterotróficas de ambientes aquáticos (APHA., 1976). Porém, acredita-se que bactérias relacionadas com a qualidade da água, como coliformes e enterobactérias patogênicas, cresçam melhor nestes meios (CONN, 1957; VOS et al., 2011). Desta forma, já foi mostrado que a utilização de meios de cultura com diferentes concentrações de nutrientes pode ser uma estratégia interessante para viabilizar o crescimento da diversidade bacteriana representativa do ecossistema estudado (GAMALIER et al., 2016).

A técnica de coloração de Gram foi utilizada na caracterização microscópica das bactérias que compunham os morfotipos de colônia. Esta técnica é um dos mais

importantes métodos de coloração utilizados na microbiologia, sendo quase sempre o primeiro passo para a caracterização de amostras de bactérias. Esta se baseia na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma, enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem. A técnica de Gram revelou que a maior proporção das bactérias foram Gram negativas (58,33%). Isto indica uma maior representatividade destas bactérias cultiváveis no Rio Negro. De fato, já é conhecido que as bactérias Gram negativas representam grande parte das bactérias em ecossistemas aquáticos (CHRÓST, 1975; DUDGEON et al., 2006).

Em paralelo, foi encontrada uma variedade de bactérias com diversas formas e arranjo celular. A forma celular predominante entre os morfotipos foram bacilos (50%) e a maioria das bactérias não apresentaram arranjo celular, sendo encontradas isoladas (58,33%). Uma diversidade de arranjos e formas é relatada para bactérias de ecossistemas aquáticos (GROSSART, 2010). Padrões de forma e tamanho das células bacterianas são características complexas e dependente de diversas variáveis que são únicas nos sistemas, tanto naturais quanto de cultivos (JUSTICE et al., 2008). Estas variáveis estão ligadas ao estilo de vida das espécies podendo estar relacionadas com fatores fisiológicos e metabólicos (YOUNG, 2006). As células bacterianas podem se agrupar em diferentes arranjos celulares. Geralmente esta é uma estratégia para otimizar o crescimento e sobrevivência em condições pouco favoráveis (JUSTICE et al., 2008). No presente estudo, as bactérias foram cultivadas em condições ótimas de crescimento. Isto pode justificar o fato de a maior proporção dos morfotipos não formarem arranjos. Contudo, o próprio fato das bactérias serem cultivadas em meios nutritivos pode alterar seu status morfológico padrão em relação ao que é encontrado no ambiente.

Após o estabelecimento das culturas bacterianas em meio sólido, os morfotipos de colônias isolados foram transferidos para meio líquido não seletivo (TSB) e cultivados à 28°C. O crescimento bacteriano apresenta 4 fases: Lag, exponencial ou Log, estacionária e declínio (Trabulsi e Alterthum, 2004). No presente trabalho, as curvas de crescimento tanto por densidade óptica do meio de cultura líquido, quanto por densidade de células bacterianas se mostraram estáveis na quarta hora. Portanto, determinou-se que a fase estacionária da cultura estudada se dá a partir da quarta hora de crescimento bacteriano no meio TSB à 28°C. Desta forma, amostras das culturas foram coletadas neste ponto para estudo ultraestrutural das bactérias por MET.

## 5.2 ULTRAESTRUTURA

A MET é uma ferramenta importante para o melhor entendimento dos aspectos morfológicos ultraestruturais da comunidade bacteriana de ecossistemas aquáticos (Silva *et al.*, 2016). Destaca-se que a MET é frequentemente utilizada para estudo de estruturas de células bacterianas em ambientes naturais e culturas (HEISSENBERGER; LEPPARD; HERNDL, 1996; HOPPERT; MAYER, 1999). No entanto, não foram encontrados dados na literatura referentes a estudos ultraestruturais de bactérias no ecossistema aquático estudado no presente trabalho. Portanto, conforme mencionado anteriormente, amostras das culturas do Rio Negro foram processadas para MET.

### 5.2.1 Ultraestrutura do Envoltório Celular das Bactérias do Rio Negro

O envoltório celular é um compartimento importante da ultraestrutura bacteriana e está envolvido com diversas funções morfológicas, fisiológicas e metabólicas, dentre essas: (1) confere a forma bacteriana, (2) fornece meios pelos quais as bactérias geram energia para crescimento e divisão, (3) atua na proteção, (3) promove patogênese, participa na transferência de DNA e outras moléculas, (4) constitui o ambiente celular através do qual a bactéria interage com seu meio, (5) permite a internalização de nutrientes e outras partículas e (5) promove a externalização de moléculas através de mecanismos de secreção, principalmente via VMEs (KLEANTHOUS; ARMITAGE, 2015; SILHAVY, THOMAS J; KAHNE, DANIEL; WALKER, SUZANNE, 2010). O envoltório celular ocupa apenas 10% do volume celular das bactérias, mas tipicamente cada célula devota um quarto de seu genoma as funções deste compartimento (KLEANTHOUS; ARMITAGE, 2015).

A MET revelou bactérias com envoltório celular apresentando diferentes espessuras e composição. Estas características refletem as diferenças típicas dos grupos bacterianos gram-positivo e gram-negativo (Fig. 10A, B e C). Bactérias com parede celular tipicamente Gram negativa, caracterizadas pela presença de membrana plasmática, espaço periplasmático e membrana externa, foram encontradas em maior proporção (77,28%, Fig. 10A e B) que as bactérias com envoltório gram-positivo, exibindo membrana plasmática, parede celular de peptidoglicano e camada S (22,72%, Fig. 10A e C). Este dado corrobora com os

resultados da coloração pela técnica de Gram que encontram maior proporção de bactérias Gram negativas. Levando em consideração que as bactérias Gram negativas são representativamente mais abundantes em ecossistemas aquáticos, podemos inferir que as bactérias Gram negativas compõe importante grupo no ecossistema aquático do Rio Negro.

Significante proporção das células com envoltório Gram negativo (85,71%) apresentaram cápsula formada por exopolímeros extracelulares (espessura média =  $45,33 \pm 18,82 \mu\text{m}$ , média  $\pm$  EP). Em ecossistemas aquáticos tropicais amazônicos, foi verificada a frequência de 31,4% de bactérias com capsula (SILVA, T. P. et al., 2014). Estruturas capsulares são componentes estruturais importantes para múltiplas funções, como interação celular com o meio, barreiras contra agentes tóxicos, proteção contra infecção viral e absorção e estoque de nutrientes (KLEANTHOS; ARMITAGE, 2015; SILVA, THIAGO P et al., 2016). Desta forma, podemos inferir que a maior ocorrência de cápsulas em culturas pode estar relacionada com maior disponibilidade de nutrientes presentes no meio de cultura.

Em paralelo, além das características morfológicas do envoltório celular bacteriano, foi possível a observação de estruturas bacterianas intra e extracelulares típicas, como flagelo (Fig. 11A), nucleóide (Fig. 11B) e grânulos (Fig. 11B). Além disso, foi possível a visualização de septos celulares (Fig. 11C) associados à divisão celular ou esporulação. A ocorrência destas estruturas reflete a grande diversidade ultraestrutural encontrada em bactérias de ecossistemas aquáticos (SILVA, T. P. et al., 2014). Esta diversidade vai além da simples descrição da forma bacteriana e está relacionada diretamente com a diversidade metabólica e fisiológica encontrada em bactérias (SILVA, THIAGO P et al., 2016).

### 5.2.2 Ultraestrutura de VMEs

As VMEs são estruturas arredondadas diminutas associadas com mecanismos de secreção bacteriano. Devido ao seu pequeno tamanho a visualização precisa das VMEs é possível somente através da MET. No presente trabalho, foi realizada uma investigação detalhada sobre a ocorrência e formação de VMEs por MET.

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, a ocorrência de processo de vesiculação detectado na superfície da membrana externa das bactérias Gram negativas cultiváveis do Rio Negro, com clara identificação da membrana com aspecto trilaminar nas vesículas secretadas (Fig. 12). Grande parte das secções

bacterianas apresentou VMEs (51,43%). Recentemente, foi documentado que as células bacterianas de ecossistemas aquáticos em cultura tem habilidade de produção dessas vesículas em condições fisiológicas normais e sob alteração (GAMALIER et al., 2016). Estas vesículas também foram identificadas *in locus* em ecossistemas aquáticos marinhos (BILLER et al., 2014) e de água doce (SILVA, T. P. et al., 2014). Porém, não existem estudos descrevendo a ocorrência e formação desta estruturas em bactérias cultiváveis do Rio Negro, mesmo se tratando de comunidade bacterianas, estas mudam sua composição trófica de um sistema para outro.

Análises quantitativas por MET mostraram que a maior proporção de VMEs foi observada isoladamente ou formando agrupamentos que se encontravam aderidas ao envoltório celular (83%, Fig. 13). Estes grupamentos podem estar associados com áreas de intensa produção de vesículas que foram observadas na superfície de algumas bactérias (Fig. 13). Apesar de ser escasso o conhecimento da biogênese das VMEs em bactérias de ecossistemas aquáticos, existem diversos mecanismos descritos para formação de VMEs em bactérias patogênicas. Em geral, o processo de formação destas vesículas está associado ao sítio de vesiculação de acordo com os componentes moleculares do envoltório celular, como: (1) composição molecular do periplasma, (2) composição lipídica e proteica da membrana externa e (3) moléculas associadas a membrana externa e/ou ao peptidoglicano (KULP; KUEHN, 2010; MASHBURN; WHITELEY, 2005; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015).

VMEs livres no meio extracelular também foram detectadas por MET (17%, Fig. 14). Essas apareceram distantes (Fig. 14A) ou próximas de grupos de bactérias (Fig. 14B). As VMEs constituem um compartimento de transporte para materiais insolúveis, conferem proteção de materiais solúveis e aumentam a eficiência do tráfego de partículas em baixa concentração no meio extracelular. As VMEs podem transportar um amplo repertório de conteúdo, como proteases, endonucleases, autolisinas, fosfolipídios, substâncias que auxiliam na formação de biofilme e aquisição de nutrientes, inibidores de toxinas do meio, moléculas de comunicação célula-célula e até mesmo DNA (HAURAT et al., 2015; RUMBO et al., 2011; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015; YONEZAWA et al., 2009). Desta forma, as vesículas apresentam persistência no meio, podendo percorrer grandes distâncias sem gasto energético na movimentação bacteriana ou até mesmo atingir locais inacessíveis às bactérias (KULP; KUEHN, 2010).



Análises morfométricas do diâmetro das VMEs revelaram vesículas de tamanhos variados (Fig. 15), com maior proporção de vesículas com menores diâmetros. Comparando o tamanho das VMEs aderidas com as livres, foi verificado que as aderidas apresentaram vesículas menores. Estas diferenças de tamanho entre as vesículas, provavelmente, se deve: (1) ao estágio de formação da vesícula o que justifica o fato de seu menor tamanho quando aderidas as células secretoras e/ou (2) ao conteúdo transportado pelas vesículas já formadas conforme comentado anteriormente (KULP; KUEHN, 2010; MCBROOM; KUEHN, 2007).

## **6. CONCLUSÕES**

Em conjunto, o presente trabalho demonstrou a capacidade de bactérias aquáticas cultiváveis do Rio Negro em secretarem VMEs durante o crescimento em cultura. A caracterização ultraestrutural destas bactérias enfatiza o fato das bactérias de ecossistemas aquáticos constituírem microrganismos complexos estruturalmente o que denota também sua complexidade funcional. O reconhecimento de estruturas dinâmicas como o envoltório celular capaz de formar vesículas de transporte extracelular mostra-se crucial para o entendimento das capacidades funcionais e adaptação de bactérias aos ecossistemas aquáticos.

## 7. REFERÊNCIAS

AMEZAGAMADRID, P. et al. TEM evidence of ultrastructural alteration on *Pseudomonas aeruginosa* by photocatalytic TiO<sub>2</sub> thin films. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 70, n. 1, p. 45-50, 2003.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 14ed.** APHA American Public Health Association, 1976.

AZAM, F. et al. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Estuaries**, v. 50, n. 2, 1983.

BARROS, N.; AL, E. Virus-bacterium coupling driven by both turbidity and hydrodynamics in an Amazonian floodplain lake. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 21, p. 7194-201, Nov 2010.

BENSON, S. A. Ultrastructure of bacteria. In: BITTAR, E. E. e NEVILLE, B. (Ed.). **Principles of Medical Biology**: Elsevier, v. Volume 9, 1998. p.1-14.

BENSON, S. A. Ultrastructure of bacteria. **Principles of Medical Biology**, v. 9, p. 1-14, 1998.

BERNARD, L. et al. Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2000.

BEVERIDGE, T. J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 181, n. 6, p. 4725–4733, 1999.

BILLER, S. J. et al. Bacterial vesicles in marine ecosystems. **Science**, v. 343, n. 6167, p. 183-186, 2014.

CHATTERJEE, S.; CHAUDHURI, K. **Outer membrane vesicles of bacteria.** Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 3642305261.

CHRÓST, R. J. Inhibitors produced by algae as an ecological factor affecting bacteria in water ecosystems. **ACTA Microbiologica Polonica**, v. 7, p. 125-133, 1975.

CONN, H. **Manual of microbiological methods.** McGraw-Hill Book Company, 1957.

COVENEY, M. F.; WETZEL, R. G. Experimental evaluation of conversion factors for the [3H] thymidine incorporation assay of bacterial secondary productivity. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 8, p. 2018-2026, 1988.

CROWLEY, J. T. et al. Lipid exchange between *Borrelia burgdorferi* and host cells. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 1, p. e1003109, 2013.

- DE CARVALHO, C. C.; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Marine drugs**, v. 8, n. 3, p. 705-727, 2010.
- DEL GIORGIO, P. A.; COLE, J. J. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 503-541, 1998.
- DUCKLOW, H. Bacterial production and biomass in the oceans. **Microbial ecology of the oceans**, v. 1, p. 85-120, 2000.
- DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological reviews**, v. 81, n. 02, p. 163-182, 2006.
- FLETCHER, T. I. et al. Viability assays of intra-erythrocytic organisms using fluorescent dyes. **Vet Parasitol**, v. 163, n. 1-2, p. 144-7, Jul 7 2009.
- FRANZINELLI, E.; IGREJA, H. Modern sedimentation in the lower Negro river, Amazonas State, Brazil. **Geomorphology**, v. 44, n. 3, p. 259-271, 2002.
- FUHRMAN, J. A.; AZAM, F. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1085-1095, 1980.
- FUHRMAN, J. A.; NOBLE, R. T. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 7, p. 1236-1242, 1995.
- GAMALIER, J. P. et al. Increased production of outer membrane vesicles by cultured freshwater bacteria in response to ultraviolet radiation. **Microbiological Research**, 2016.
- GOULD, S. B.; GARG, S. G.; MARTIN, W. F. Bacterial Vesicle Secretion and the Evolutionary Origin of the Eukaryotic Endomembrane System. **Trends in microbiology**, 2016.
- GROSSART, H. P. Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 6, p. 706-714, 2010.
- HAURAT, M. F.; ELHENAWY, W.; FELDMAN, M. F. Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. **Biological chemistry**, v. 396, n. 2, p. 95-109, 2015.
- HEISSENBERGER, A.; LEPPARD, G. G.; HERNDL, G. J. Relationship between the Intracellular Integrity and the Morphology of the Capsular Envelope in Attached and Free-Living Marine Bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, n. 12, p. 4521-4528, 1996.
- HOPPERT, M.; MAYER, F. Principles of macromolecular organization and cell function in bacteria and archaea. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 31, n. 3, p. 247-284, 1999.
- JUSTICE, S. S. et al. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 162-168, 2008.

- KALFF, J. **Limnology: inland water ecosystems**. 2002. ISBN 0130337757.
- KLEANTHOUS, C.; ARMITAGE, J. P. The bacterial cell envelope. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1679, 2015.
- KULP, A.; KUEHN, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annual review of microbiology**, v. 64, p. 163, 2010.
- LINDEMAN, R. L. The trophic-dynamic aspect of ecology. **Ecology**, v. 23, n. 4, p. 399-417, 1942.
- MASHBURN, L. M.; WHITELEY, M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 422-425, 2005.
- MCBROOM, A. J.; KUEHN, M. J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. **Molecular microbiology**, v. 63, n. 2, p. 545-558, 2007.
- MELO, R. C. et al. Histological approaches for high-quality imaging of zooplanktonic organisms. **Micron**, v. 38, n. 7, p. 714-721, 2007.
- MOREIRA-TURCQ, P. et al. Exportation of organic carbon from the Amazon River and its main tributaries. **Hydrological Processes**, v. 17, n. 7, p. 1329-1344, 2003.
- MORTATTI, J.; VICTÓRIA, R.; TARDY, Y. Balanço de alteração e erosão química na Bacia Amazônica. **Geochimica Brasiliensis**, v. 11, n. 1, 2011.
- MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in lipid research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.
- PÉREZ-CRUZ, C. et al. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1874-1881, 2013.
- POMERO, L. R.; DARWIN, C. The microbial loop. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 28, 2007.
- POMEROY, L. R. The ocean's food web, a changing paradigm. **Bioscience**, v. 24, n. 9, p. 499-504, 1974.
- POMEROY, L. R.; WIEBE, W. J. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, n. 2, p. 187-204, 2001.
- PRESCOTT, L.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. **Microbiology, Wm. C: Brown Publishers**, Chicago, London 1996.
- PRESCOTT, L. M.; HARLEY, P. J.; DONALD, A. K. **Microbiology**. 5<sup>a</sup> ed. The MacGraw-Hill Companies, 2002.

RIVERA, J. et al. Bacillus anthracis produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 44, p. 19002-19007, 2010.

ROTHFIELD, L.; TAGHBALOUT, A.; SHIH, Y.-L. Spatial control of bacterial division-site placement. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 959-968, 2005.

RUMBO, C. et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in Acinetobacter baumannii. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 7, p. 3084-90, Jul 2011.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 605-619, 2015.

SHERR, E.; SHERR, B. Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 5, p. 1225-1227, 1988.

SIGEE, D. C. Bacteria: the main heterotrophic microorganisms in freshwater systems. **Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment**, p. 287-338, 2005a.

\_\_\_\_\_. **Front Matter**. Wiley Online Library, 2005b. ISBN 0470011254.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 5, 2010.

SILVA, T. P.; GAMALIER, J. P.; MELO, R. C. TEM as an Important Tool to Study Aquatic Microorganisms and their Relationships with Ecological Processes. 2016.

SILVA, T. P. et al. Visualizing aquatic bacteria by light and transmission electron microscopy. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 1, p. 1-14, Jan 2014.

SILVA, T. P. et al. Visualizing aquatic bacteria by light and transmission electron microscopy. **Antonie van Leeuwenhoek: Journal of Microbiology**, v. in press, 2013.

SIOLI, H. Amazônia. **Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais. Tradução de Johann Becker. 3ª edição. Petrópolis, Rio de Janeiro. Editora Vozes Ltda**, 1991.

SOARES, M. C. S. et al. Light microscopy in aquatic ecology: methods for plankton communities studies. **Light Microscopy: Methods and Protocols**, p. 215-227, 2011.

TASHIRO, Y.; UCHIYAMA, H.; NOMURA, N. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environ Microbiol**, v. 14, n. 6, p. 1349-62, Jun 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia; Microbiology**. Atheneu, 2004. ISBN 8573796812.

VOS, P. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer Science & Business Media, 2011. ISBN 0387684891.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. What are bacterial extracellular polymeric substances? In: (Ed.). **Microbial extracellular polymeric substances**: Springer, 1999. p.1-19.

YONEZAWA, H. et al. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 197, 2009.

YOUNG, K. D. The selective value of bacterial shape. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 70, n. 3, p. 660-703, 2006.