

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

Juliana Gamalier de Paiva

**BACTÉRIAS AQUÁTICAS CULTIVÁVEIS SOB EFEITO DA RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA: AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO,
VIABILIDADE CELULAR E ULTRAESTRUTURA**

JUIZ DE FORA
2013

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

Juliana Gamalier de Paiva

**BACTÉRIAS AQUÁTICAS CULTIVÁVEIS SOB EFEITO DA RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA: AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO,
VIABILIDADE CELULAR E ULTRAESTRUTURA**

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 a Conservação e Manejo de
Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Rossana Correa Netto de Melo

JUIZ DE FORA

2013

Gamaliel, Juliana de Paiva

Bactérias aquáticas cultiváveis sob efeito da radiação ultravioleta: avaliação da curva de crescimento, viabilidade celular e ultraestrutura./ Juliana Gamaliel de Paiva. -2013. 105f.

Dissertação (Mestrado em Ecologia)- Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

1. Bactérias aquáticas. 2. Cultura de bactérias aquáticas. 3. Radiação ultravioleta. 4. Microscopia eletrônica de transmissão. 5. Curva de crescimento bacteriano. 6. Ultraestrutura bacteriana. 7. Morte celular.

**BACTÉRIAS AQUÁTICAS CULTIVÁVEIS SOB EFEITO DA RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA: AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO,
VIABILIDADE CELULAR E ULTRAESTRUTURA.**

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 a Conservação e Manejo de
Recursos Naturais.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Cláudio Galuppo Diniz, Dr.

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Luciana Oliveira Vidal, Dr^a.

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a Rossana Correa Netto de Melo, Dr^a.- Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

“Se Deus tivesse isentado o homem do trabalho do corpo, seus membros estariam atrofiados; se o tivesse isentado do trabalho da inteligência, seu espírito teria permanecido na infância, num estado de instinto animal; por isso lhe fez do trabalho uma necessidade e lhe disse: *procura e acharás, trabalha e produzirás*; dessa maneira será o filho das tuas obras, delas terás o mérito e serás recompensado segundo o que tiveres feito.”

Allan Kardec

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus e todas boas energias que me ampararam e possibilitaram a conclusão de mais esta etapa.

Agradeço à minha orientadora, Rossana Melo, pela orientação, mas principalmente pela confiança na minha capacidade, apoio na minha trajetória, incessantes oportunidades e pelas portas sempre abertas do laboratório. Agradeço por ser seu exemplo de boa profissional.

Agradeço ao Prof. Fábio Roland, pela pareceria, apoio e incentivo na minha trajetória. E pelo enorme suporte oferecido, cedendo espaço do Laboratório de Ecologia Aquático (LEA) da UFJF para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Hélio Chiarini-Garcia e ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) pela colaboração no processamento de microscopia eletrônica.

Agradeço à Prof^a Cristina Rossi Nakayama (USP) pelo acolhimento, dedicação e ensinamentos, tão generosamente a mim oferecidos.

Agradeço à Prof^a Luciana Vidal, pelo apoio nos experimentos e coletas, sempre contribuindo e torcendo pelo sucesso do trabalho.

Agradeço, imensamente, ao meu amigo e irmão Thiago Pereira da Silva, que esteve presente em todas as etapas deste trabalho, compartilhando seu conhecimento e ensinando passo a passo o desenvolver de uma pesquisa. E que em todos os momentos não me deixou faltar forças para continuar, paciência com os contratempos e serenidade nas decisões.

Agradeço ao Nathan Barros pelo incentivo e ideias oferecidos. À Natália Noyma pelo apoio e inspiração para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos do Laboratório de Ecologia Aquática (LEA) da UFJF que pacientemente me receberam. Em especial aqueles que me ajudaram na coleta e nas análises: Gladson, Anderson, Caíque e Mariana.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular da UFJF, pelo grande apoio, ajuda e incentivo: Kennedy, Daniel, Aline, Gabriel, Douglas e Prof^a Heloísa D'Avila. Em especial, ao Felipe Dias pela análise ao microscópio eletrônico, bem como à Lívia Andressa e Kátia Amaral no processamento do material.

Agradeço ao Victor Zarantonello e Flávia Maria pela ajuda nos experimentos e análises, por sua imensa dedicação ao sucesso do trabalho.

Agradeço aos amigos, Irene, José, Raquel e Ana Maria que me acolheram nas inúmeras madrugadas para a escrita do trabalho, e pelo incentivo espiritual.

Agradeço às minhas grandes amigas, Patrícia e Elaine, que acreditaram na minha caminhada e incentivaram em todas as horas de fraqueza.

Agradeço à todos os amigos, presentes e menos presentes, pelas palavras de incentivo e forças.

Finalmente, agradeço à Deus por ter me concedido uma linda família, que é meu alicerce. Agradeço aos meus pais, Gamalier e Célia, meus maiores tesouros e exemplos, por acreditar e apostar nos meus sonhos, pelos incentivos em todas as horas, por me trazer sempre à realidade, pelo apoio constante em minha trajetória e pelo amor que a mim dedicam. Agradeço aos meus irmãos, Adriano e Rodrigo, e minha vó, Inilda, pela paciência, amor e incentivo. Não podendo esquecer o agradecimento extensivo à toda a Família Buscapé: tios (Julinho, Torja, Nilmara e Cibelli) e primos (Daniele, Marina, Janaina, Thainá, Letícia, Lucas e Matheus).

RESUMO

A comunidade bacteriana é um componente chave da alça microbiana na cadeia trófica em ecossistemas aquáticos, atuando na ciclagem de matéria orgânica e fluxo de energia. O estabelecimento de modelos experimentais para estudo de bactérias aquáticas é essencial para entendimento de fatores isolados que interferem na dinâmica da comunidade bacteriana. A radiação ultravioleta é uma radiação não ionizante que constitui cerca de 9% da radiação solar que incide em ecossistemas aquáticos. Potencialmente, a radiação solar pode induzir mudanças na composição da comunidade bacteriana, capaz de alterar diretamente a estrutura celular das bactérias provocando principalmente danos no DNA, proteínas e outras moléculas. O crescente aumento da incidência da radiação ultravioleta sobre os ecossistemas aquáticos torna importante estudos que contribuam na avaliação de seus efeitos em bactérias, à nível celular e de comunidade. O presente trabalho teve por objetivo estabelecer um modelo de cultura de bactérias aquáticas de água doce e investigar a ação da radiação ultravioleta sobre a comunidade bacteriana cultivável. Para estabelecimento de culturas bacterianas, amostras foram coletadas do reservatório do Funil (RJ), submetidas à diluição seriada e semeadas por técnica de “spread-plate” em dois meios de cultura sólidos não seletivos: R2A e TSA. Colônias foram caracterizadas por aspectos morfológicos e transferidas para meio líquido não seletivo, TSB. A curva de crescimento bacteriano foi estabelecida por densidade óptica através de espectrofotometria e por densidade bacteriana com utilização de marcador fluorescente (DAPI). Bactérias em meio líquido foram submetidas à radiação ultravioleta (UV-A+UV-B) durante três horas. A cada hora foram retiradas amostras e analisadas: (i) curva de crescimento por densidade óptica e densidade bacteriana, (ii) viabilidade celular, utilizando *kit BacLight* por microscopia de fluorescência e (iii) ultraestrutura e integridade ultraestrutural, por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nossos resultados apontaram que o uso de diferentes meios de cultura (R2A e TSA) possibilitou o estabelecimento de um modelo de cultura de bactérias aquáticas de água doce. O meio R2A foi considerado o mais indicado para o cultivo de bactérias aquáticas, pois possibilitou o crescimento de maior diversidade de morfotipos de colônias (6). Análises da curva de crescimento bacteriano durante a exposição à radiação ultravioleta demonstraram uma queda na densidade bacteriana, quando avaliadas por densidade óptica e densidade de células. A radiação ultravioleta induziu aumento significativo na mortalidade de bactérias aquáticas cultiváveis, conforme demonstrado pelas análises de viabilidade celular. Após três horas de exposição à radiação, ocorreu aumento significativo de células inviáveis em comparação com o grupo controle e com a primeira hora de exposição. Nossos dados também demonstraram que o tempo de exposição à radiação ultravioleta interfere negativamente no crescimento e positivamente na mortalidade das bactérias aquáticas. A MET revelou considerável diversidade ultraestrutural de bactérias aquáticas no modelo de cultura estabelecido. Análises ultraestruturais demonstraram que a radiação ultravioleta induz alterações morfológicas em bactérias aquáticas assim como morte desses microorganismos. A radiação ultravioleta também induziu maior frequência de bactérias gram-positivas com camada S e/ou cápsula, o que pode estar relacionada com adaptações morfológicas. A maioria das bactérias gram-positivas encontradas no grupo UV estava íntegra, sugerindo papel protetor da camada S à radiação ultravioleta. Em contrapartida, bactérias gram-negativas foram mais afetadas pela radiação ultravioleta. Estes resultados reforçam que bactérias aquáticas em cultura possuem mecanismos de reparo a danos causados pela radiação ultravioleta. Em conjunto, os resultados do

presente estudo demonstraram que a radiação ultravioleta afeta a comunidade de bactérias aquáticas de água doce, induzindo alterações ultraestruturais e morte. Além disso, estabeleceu-se um modelo de cultura de bactérias aquáticas de água doce que pode contribuir para o entendimento de diferentes aspectos da comunidade bacteriana e para outros estudos de estresses ambientais.

Palavras-chave: Bactérias aquáticas. Cultura de bactérias aquáticas de água doce. Radiação ultravioleta. Microscopia eletrônica de transmissão. Curva de crescimento bacteriano. Ultraestrutura bacteriana. Morte celular.

ABSTRACT

Aquatic bacteria is a key component of microbial loop in the aquatic food web. These organisms have important roles in the cycling of organic matter and energy flow in aquatic ecosystems. Experimental models using aquatic bacteria are essential for understanding how isolated factors affect bacterial communities dynamics. Ultraviolet radiation is a non-ionizing radiation which corresponds to 9% of solar radiation that falls on the aquatic ecosystems. It shifts bacterial communities composition and induces cellular changes by damaged caused in DNA and proteins structures. Because the incidence of ultraviolet radiation on aquatic ecosystems has been increasing, studies focused on the effects of this radiation on bacteria at both cellular and community level are very important. The present work aimed to establish a culture model of freshwater aquatic bacteria and investigate the action of ultraviolet radiation on the cultured bacterial community. For bacterial cultures, samples were collected from Funil Reservoir (RJ), serially diluted and spread-plate in two non-selective solid culture media: R2A and TSA. Colonies were characterized through morphological aspects and transferred to non-selective liquid media (TSB). The grown curve was established by optical density through spectrophotometry and by cell density using a fluorescent marker (DAPI) through fluorescence microscopy. Liquid cultures were exposed to ultraviolet radiation (UVA+UVB) during three hours. Hourly samples were collected and the following parameters were analyzed: (i) growth curves by optical density and cell density; (ii) cellular viability using the *Baclight kit*; and (iii) ultrastructural changes by transmission electron microscopy (TEM). The use of different culture media (R2A and TSA) enabled the establishment of a freshwater aquatic bacteria model. A higher number of morphotype colonies was observed when R2A medium was used and, therefore, this culture medium was considered more suitable for culturing aquatic bacteria. Bacteria exposed to ultraviolet radiation showed a decreased bacterial density, as measured by optical and bacterial density. Ultraviolet radiation induced a significant increase of the aquatic bacteria mortality in culture, as demonstrated by the cell viability evaluations. On the third hour of exposure to ultraviolet radiation, we detected a higher number of non-viable cells in comparison with those found after the first hour of radiation exposure and controls. Moreover, our data also demonstrated that the ultraviolet exposure time negatively interferes with the aquatic bacterial growth and positively with aquatic bacterial mortality. TEM revealed great ultrastructural diversity of aquatic bacteria in the culture model and demonstrated that ultraviolet radiation induces ultrastructural changes and death in aquatic bacteria. In the ultraviolet radiation-treated-group, it was found a higher frequency of gram-positive bacteria with S-layer and/or capsule than in control group. Most gram-positive bacteria in UV group presented intact ultrastructure. In contrast, gram-negative bacteria were more affected by the ultraviolet radiation. These findings indicate that the S-layer have a protective role against ultraviolet radiation and that repair mechanisms were likely triggered by the bacterial community in response to this radiation.. Altogether, the results of the present work demonstrate that the ultraviolet radiation affects fresh water bacterial communities in culture by inducing ultrastructural changes and cell death. Moreover, it was established a culture model of fresh water bacteria that may contribute to the understanding of different aspects of the bacterial community and other studies focused on environmental stress

Keywords: Aquatic bacteria. Freshwater aquatic bacteria culture. Ultraviolet radiation. Transmission electron microscopy. Bacterial growth curve. Bacterial ultrastructural. Cell death.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CFC	Clorofluorcarbonos
COD	Carbono orgânico dissolvido
COP	Carbono orgânico particulado
CPD	Dímeros de pirimidina ciclobutano
DNA	Ácido desoxiribonucleico
LPS	Lipopolissacarídeos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MOD	Matéria orgânica dissolvida
NAG	N-acetil-glicosamina
NAM	N-acetilmurâmico
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHB	Poli- β -hidroxibutírico
PER	Reparação fotoenzimática
RNA	Ácido ribonucléico
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
TAG	Lipídeos neutros como trigliceróis
UFC	Unidade formadora de colônias
UV	Raios ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	BACTÉRIAS AQUÁTICAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPORTÂNCIA TRÓFICA	16
1.2	ULTRAESTRUTURA BACTERIANA	19
1.2.1	Membrana Plasmática	20
1.2.2	Parede Celular	22
1.2.2.1	Parede celular de bactérias gram-positivas	22
1.2.2.2	Membrana externa de bactérias gram-negativas	23
1.2.3	Estruturas Capsulares	24
1.2.4	Estruturas Citoplasmáticas	26
1.2.4.1	Ribossomos	26
1.2.4.2	Grânulos	26
1.2.4.3	Corpúsculos lipídicos	27
1.2.4.4	Vacúolos gasosos	27
1.2.4.5	Citoesqueleto	27
1.2.4.6	Nucleoide	28
1.2.4.7	Tilacóides	28
1.2.4.8	Apêndices locomotores	29
1.2.4.9	Partículas virais	29
1.3	MORTE BACTERIANA EM ECOSSITEMAS AQUÁTICOS	30
1.4	RADIAÇÃO SOLAR: CONSIDERAÇÕES GERAIS	32
1.4.1	Radiação Ultravioleta e Camada De Ozônio	32

1.4.2	Fotobiologia Celular	34
1.4.3	Efeitos da Radiação Ultravioleta sobre Ecossistemas Aquáticos	35
1.4.4	Efeitos da Radiação Ultravioleta sobre Comunidade Bacteriana Aquática	36
1.4.5	Efeitos da Radiação Ultravioleta sobre a Estrutura Bacteriana	37
1.4.6	Mecanismos de Defesa contra Radiação Ultravioleta em Bactérias	38
1.4.7	Fatores que Influenciam a Radiação Ultravioleta em Ambientes Aquáticos	40
1.4.8	Efeitos da Radiação Ultravioleta nas Teias Tróficas Aquáticas	41
1.4.9	Efeitos da Radiação Ultravioleta sobre Ciclos Biogeoquímicos Aquáticos	42
2	JUSTIFICATIVA E OBEJTIVO GERAL	45
3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	ÁREA DE COLETA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	46
4.2	ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS	47
4.2.1	Diluição Seriada das Amostras	48
4.2.2	Meios de Cultura e Plaqueamento	49
4.2.3	Semeadura	49
4.2.4	Caracterização Morfológica Macroscópica das Colônias Bacterianas	50
4.2.5	Isolamento e Coleção das Colônias Morfotipos	51
4.2.5.1	Isolamento	51

4.2.5.2	Conservação e coleção	52
4.3	EXPERIMENTOS COM RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	53
4.3.1	Lâmpadas	53
4.3.2	Transferência de Morfotipos Isolados para Cultura Líquida e Determinação da Fase Estacionária da Comunidade Bacteriana	54
4.3.3	Desenho Experimental	55
4.4	VIABILIDADE CELULAR	57
4.5	CURVA DE CRESCIMENTO	59
4.5.1	Densidade Óptica por Espectrofotometria	59
4.5.2	Densidade Bacteriana	59
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	60
4.7	OBTENÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS	61
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4.9	DESTINO DE MEIOS DE CULTURA E MATERIAIS UTILIZADOS NOS ENSAIOS	62
5	RESULTADOS	63
5.1	ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS	63
5.1.1	Aspectos Morfológicos das Colônias Bacterianas	63
5.2	CURVAS DE CRESCIMENTO	66
5.2.1	Curva de Crescimento Padrão por Densidade Óptica	66
5.2.2	Curva de Crescimento Padrão por Densidade Bacteriana	66
5.3	RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	67
5.3.1	Análise da Curva de Crescimento por Densidade Óptica	67

5.3.2	Análise da Curva de Crescimento Bacteriano por Densidade Bacteriana	67
5.4	VIABILIDADE CELULAR	69
5.5	ULTRAESTRUTURA	72
5.5.1	Aspectos Gerais	72
5.5.2	Integridade Ultraestrutural	73
5.5.3	Integridade Ultraestrutural x Envoltório Celular	74
6	DISCUSSÃO	81
6.1	ESTABELECIMENTO DE CULTURAS CRESCIMENTO E VIABILIDADE DE BACTÉRIAS	81
6.2	AQUÁTICAS EXPOSTAS À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	83
6.2.1	Crescimento Bacteriano	83
6.2.2	Viabilidade e morte celular de bactérias submetidas à radiação ultravioleta	83
6.3	ULTRAESTRUTURA BACTERIANA	85
6.3.1	Diversidade Ultraestrutural	86
6.3.2	Alterações e Integridade Ultraestrutural	87
6.3.2.1	Frequência de estruturas observadas: Grupo Controle x Grupo UV	88
6.3.2.2	Integridade Ultraestrutural	89
7	Conclusões	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	Anexo: Artigo “Vizualizing aquatic bactéria by light and transmission electron microscopy”	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 BACTÉRIAS AQUÁTICAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPORTÂNCIA TRÓFICA

As bactérias são microrganismos procariotos encontrados nos mais diversos habitats, ocorrendo em ambientes extremos, como na ausência de oxigênio e de luz e em altas temperaturas. As bactérias estão entre os seres vivos mais antigos, colonizando nosso planeta há cerca de 3,5 milhões de anos, sendo abundantes em sistemas aquáticos continentais e marinhos, na ordem de grandeza de 10^2 a 10^6 células/mL (Azam *et al.*, 1983; Singee, 2005). Nos ambientes aquáticos, as bactérias encontram-se entre os menores organismos. As formas planctônicas (Fig. 1) medem, em geral, de 0,2 a 0,5 μm , mas podem atingir até 100 μm quando se desenvolvem aderidas a superfícies ou em sedimentos. As células bacterianas possuem, na sua maioria, o tamanho entre 0,2-2 μm , fazendo parte do picoplâncton, contudo são encontradas células inferiores a 0,2 μm , pertencendo ao fentoplâncton.

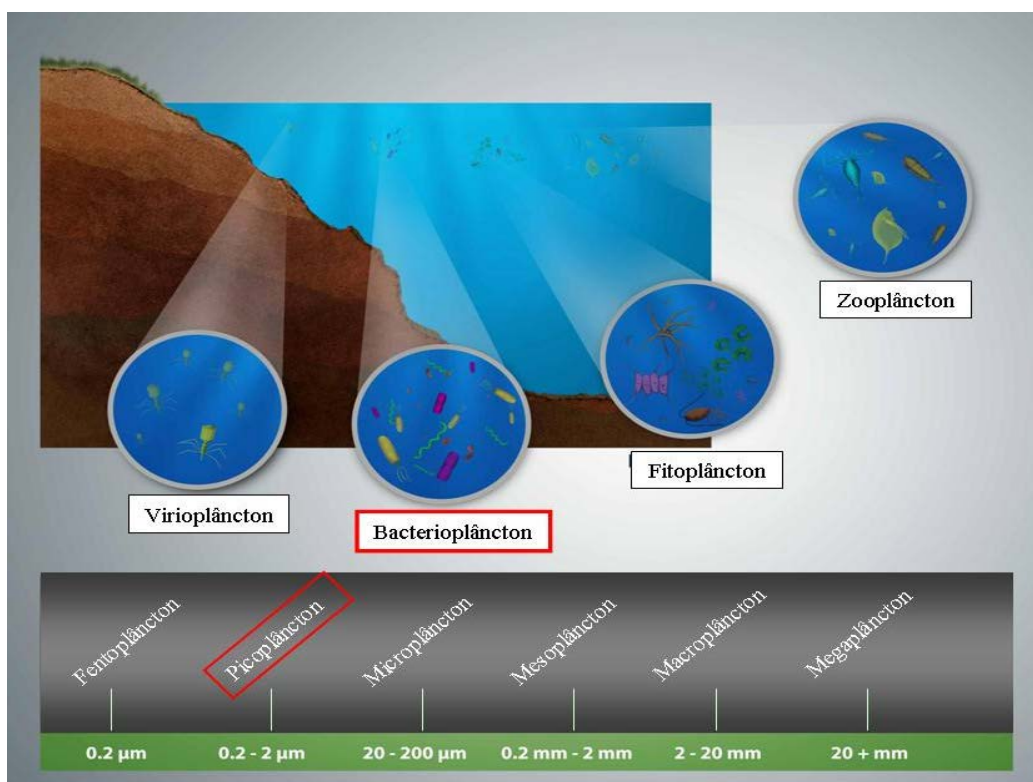


Figura 1: Classificação planctônica baseada no nicho ecológico e classe de tamanho. Em destaque (retângulos vermelhos) o bacterioplâncton. Adaptado de Soares, Lobão et al (2011).

Trabalhos pioneiros de Pomeroy (1974) e Azam et al. (1983) reconheceram o potencial importante de bactérias aquáticas na ciclagem de matéria dos oceanos. O bacterioplâncton é, de fato, um componente chave na cadeia trófica de ambientes aquáticos, principalmente por sua grande variedade metabólica, conforme demonstrado por diversos estudos posteriores (Del Giorgio e Cole, 1998; Ducklow, 2000; Klug, 2005; Pomeroy *et al.*, 2007; De Carvalho e Fernandes, 2010). Considerando a obtenção de carbono celular com principal classificação metabólica, encontram-se bactérias autotróficas, quando o carbono é obtido pela redução de CO₂, e heterotróficas, quando este é obtido pela redução de substâncias orgânicas (Kalf, 2001). Estas últimas estão entre os principais grupos procariontes dos sistemas aquáticos (Singee, 2005). As bactérias ainda podem ser classificadas quanto à fonte de energia utilizada na oxidação da matéria orgânica, como quimiossintetizantes e fotossintetizantes, e pela fonte de elétrons necessária ao crescimento, como organotróficas e litotróficas (Kalf, 2001).

A comunidade bacteriana tem sido reconhecida, desde os primórdios da Ecologia, como decompositora da matéria orgânica, assumindo papel central no retorno dos nutrientes para os ecossistemas aquáticos e terrestres. Como exemplo, cita-se o trabalho clássico de Lindemann (1942), onde as bactérias foram considerados os primeiros organismos dentro da cadeia trófica microbiana (Lindeman, 1942). Nas teorias modernas, o papel das bactérias está baseado no mecanismo de consumo da matéria orgânica, ou carbono orgânico dissolvido (COD), e sua transformação em matéria orgânica particulada (COP). Desta forma, o carbono que se encontrava teoricamente inacessível aos organismos heterotróficos, é reintroduzido nas teias alimentares (Fuhrman e Azam, 1980). O termo “elo microbiano” ou “alça microbiana” (“microbial loop”) foi inicialmente sugerido para designar a cadeia alimentar que inclui as bactérias e seus principais predadores, os protozoários (Azam et al., 1983).

Atualmente, acredita-se que grande parte do fluxo de carbono nos ecossistemas aquáticos flui através das bactérias (Pomeroy *et al.*, 2007), sendo este elo um componente de uma teia alimentar microbiana muito mais complexa. Portanto, na prática, se torna difícil separar o elo microbiano das teias alimentares microbianas, porque as interações nesse nível incluem todos os organismos unicelulares procariontes e eucariontes, autotróficos e heterotróficos. Segundo Sherr e Sherr (1988), existem tantos elos diretos entre algas e microrganismos heterotróficos que o elo microbiano não pode ser separado do restante da teia alimentar microbiana. Uma visão mais ampla das

teias alimentares microbianas e sua relação com os níveis tróficos superiores encontram-se representadas na Fig. 2.

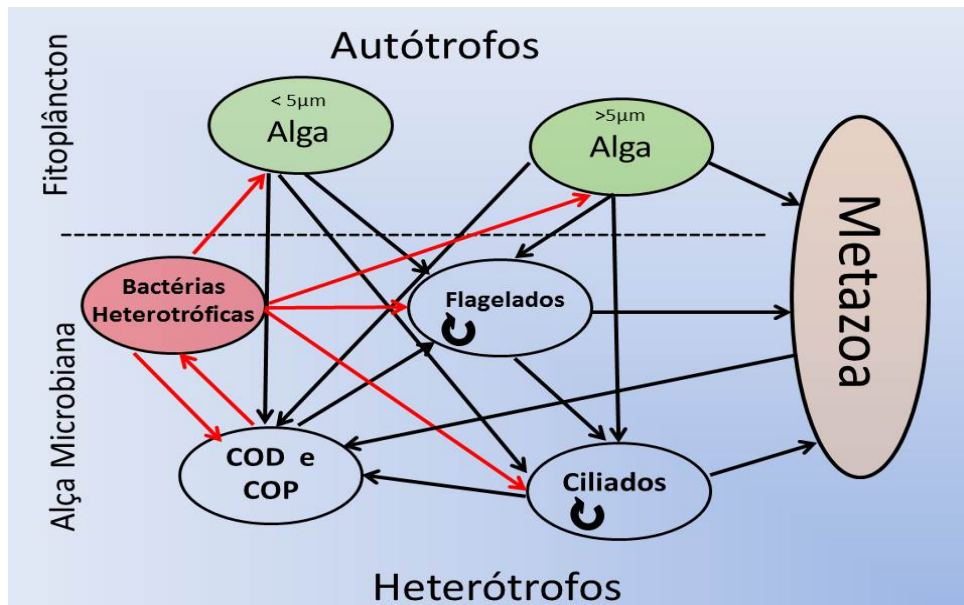


Figura 2: Esquema de interações tróficas da cadeia microbiana, adaptado de Sherr & Sherr (1988).

A alga microbiana tem papel relevante na absorção e recuperação de matéria orgânica dissolvida e na transferência para níveis superiores, fazendo desta, uma via importante para o fluxo de energia e ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos (Azam *et al.*, 1983). A eficiência com que as bactérias convertem a matéria orgânica para a biomassa está relacionada a quantidade de carbono que pode passar através delas para níveis tróficos superiores. Esta eficiência é resultado do balanço entre a produção e a respiração bacteriana, variando extremamente entre os sistemas aquáticos. Geralmente, uma fração muito pequena ($< 30\%$) da matéria orgânica é convertida para biomassa bacteriana, considerando quase todas as fontes de carbono (Del Giorgio e Cole, 1998).

Vários fatores abióticos e bióticos influenciam a abundância e a produção da comunidade bacteriana. Em alguns sistemas aquáticos, a abundância e atividade bacterianas parecem ser limitadas por fatores abióticos, tais como a temperatura e as concentrações de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (Coveney e Wetzel, 1988). Esta limitação se deve ao fato das bactérias utilizarem matéria orgânica pobres nesses nutrientes, precisando recorrer a fontes adicionais na coluna d'água. Uma vez que bactérias e fitoplâncton absorvem nutrientes disponíveis na coluna d'água, pode-se

concluir que, em alguns sistemas, ambas comunidades são competidoras (Wang, Miller e Priscu, 1992). Outro controle é através da liberação de COD pelo fitoplâncton, através de produtos fotossintéticos, e pela autólise e/ou lise causada por vírus ou outras bactérias (Wetzel, 2006). Durante a morte celular, a perda da integridade de membrana libera COD composto por moléculas orgânicas simples de fácil incorporação. O papel do zooplâncton estaria relacionado com o rompimento de células algais e a consequente liberação de COD durante a predação e excreção de COD (Laybourn-Parry e Parry, 2000).

A radiação solar, especialmente a ultravioleta (UV), também contribui para o aumento do COD em vários ecossistemas aquáticos. Esse processo está associado com a quebra dos compostos húmicos de grande peso molecular que resulta no aumento das concentrações de moléculas orgânicas menores, mais facilmente utilizáveis pela comunidade bacteriana, influenciando o ciclo de carbono e as teias alimentares microbianas nos ecossistemas aquáticos (Wetzel, 2006).

Desta forma, observa-se um controle positivo da comunidade bacteriana onde o seu crescimento é estimulado (1) pela liberação do COD pelos produtores primários, (2) zooplâncton, (3) disponibilidade e qualidade de nutrientes, (4) predação, (5) temperatura e (6) quebra de moléculas orgânicas pelos raios ultravioletas. Por outro lado, o controle negativo bacteriano é feito (1) pela queda do COD, (2) pelo efeito da predação basicamente de ciliados e flagelados heterotróficos (Abreu, Biddanda e Odebrecht, 1992; Wetzel, 2006) e (3) lise celular causada pela infecção de bacteriófagos (Fuhrman, 1999).

A comunidade bacteriana nos ecossistemas aquáticos flutua de acordo com as mudanças físico-químicas do meio que circunda. Em ambiente onde ocorrem rápidas variações espaço-temporais, as bactérias precisam responder eficientemente a estas mudanças, o que envolve adaptações fisiológicas para suportar períodos de redução de matéria orgânica e energia (Grossart, 2010).

1.2 ULTRAESTRUTURA BACTERIANA

A ultraestrutura bacteriana começou a ser investigada em maiores detalhes a partir das décadas de 50 e 60, devido a melhoramentos nas técnicas de microscopia eletrônica, as quais proporcionaram uma análise mais refinada da organização bacteriana (Hoppert

e Mayer, 1999). Contrariando a idéia que a célula bacteriana seria extremamente simples, constituída por moléculas flutuantes. Hoppert e Mayer (1999) defenderam a presença de estruturas bem definidas com elevado nível de organização celular .

Bactérias são células típicas que contêm cerca de 70% em peso de água. A maior parte desta água é no citoplasma onde serve como solvente para a solução concentrada de íons, proteínas, ácidos nucleicos, precursores metabólicos, e outras pequenas moléculas (Benson, 1998), sendo envolvido por um sistema unitário de membrana. Porções das células que possuem uma funcionalidade bioquímica específica são estruturalmente separadas do resto do citoplasma e consideradas como compartimentos bacterianos (Benson, 1998; Hoppert e Mayer, 1999; Kerfeld, Heinhorst e Cannon, 2010).

De maneira geral, as bactérias são constituídas por uma membrana plasmática que delimita o citoplasma, onde são encontradas diversas estruturas, como ribossomos, mesossomos, nucleóides e alguns grânulos. Algumas bactérias podem apresentar parede celular, camadas capsulares externas e flagelo (Prescott, Harley e Donald, 2002).

Para o melhor entendimento do papel bacteriano dentro da cadeia trófica microbiana, é essencial a compreensão da sua morfofisiologia. As estruturas bacterianas são descritas em maiores detalhes a seguir.

1.2.1 Membrana Plasmática

A membrana plasmática é a estrutura responsável pela separação do meio interno e externo, promovendo a individualização do citoplasma tanto em células procarióticas, quanto em células eucarióticas. A membrana plasmática bacteriana é composta por proteínas (60%) e lipídeos (40%), sendo os fosfolipídios os mais importantes (Prescott, Harley e Donald, 2002). Quando observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), a membrana apresenta-se com aspecto trilaminar idêntico aos 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 maioria das membranas bacterianas se diferencia das eucarióticas pela ausência de esteróis. Além das interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, cátions como de Mg^{2+} e Ca^{2+} , são responsáveis pela manutenção da integridade da membrana

(Silhavy, Kahne e Walker, 2010). A manutenção da integridade da membrana celular é vital para as bactérias, pois é protagonista da permeabilidade de solutos, responsável pela manutenção energética das células, pela transdução de sinais e outros processos mediados que produzem energia, além de manter a homeostase celular (Sikkema, De Bonte e Poolman, 1995).

No transporte de solutos a membrana atua como uma barreira altamente seletiva, impedindo a passagem livre de moléculas e íons, possibilitando a concentração de metabólitos dentro da célula. Além disso, a excreção de substâncias também ocorre através da membrana. Este transporte pode acontecer sem o gasto energético e com gasto energético através de proteínas carreadoras (Trabulsi e Alterthum, 2004).

A produção de energia acontece por transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, pela presença de citocromo e de enzimas da cadeia de transporte de elétrons presente na membrana plasmática, conferindo uma função análoga à da membrana interna das mitocôndrias em células eucarióticas (Prescott, Harley e Donald, 2002).

As enzimas de síntese de lipídeos da membrana e outras classes de macromoléculas estão ligadas à membrana plasmática. Quando sintetizadas, estas moléculas são permeadas para a face externa por prolongamentos da membrana plasmática que se unem à membrana externa, chamados de junção de Bayer (Trabulsi e Alterthum, 2004). Na membrana encontram-se também proteínas do complexo de duplicação de DNA.

Existem estruturas especializadas na membrana plasmática, descritas por Fitz-James (1960) como mesossomos e caracterizadas como invaginações múltiplas da membrana (Reavely e Burge, 1972), que desempenham papel importante na divisão celular, em analogia ao fuso mitótico em células eucariotas, no transporte de elétrons, concentrando enzimas envolvidas nesse processo, e na formação de endósporos (Prescott, Harley e Donald, 2002; Trabulsi e Alterthum, 2004). A formação de mesossomos pode ser artificialmente induzida por certos processos de preparação da célula (etapa de fixação) e tratamentos com altas concentrações de glicerol (Higgins, Tsien e Daneo-Moore, 1976). Com vários processos vitais acontecendo na membrana plasmática, a perda de sua integridade é irreversível denotando inviabilidade ou morte celular.

1.2.2 Parede Celular

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 dos componentes celular, foi verificado que este fato se deve à diferença na composição de estrutura da parede celular (Benson, 1998).

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, mucopetídeo ou peptidoglicano. Trata-se de uma macromolécula formada pela alternância de N-acetil-glicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM) ligados por pontes peptídicas. A forma das células é determinada pelo comprimento das cadeias de peptidoglicano e pela quantidade de ligações entre suas subunidades (Trabulsi e Alterthum, 2004; Cabeen e Jacobs-Wagner, 2005).

1.2.2.1 Parede celular de bactérias gram-positivas

Bactérias gram-positivas apresentam parede celular espessa (20 a 80nm) (Fig. 3), composta de de peptidoglicano (cerca de 75%) organizado em uma ou mais camadas, proteínas e ácidos tecóicos. Ácidos tecóicos inclui todos os polímeros formados por resíduos de glicerol e ribitol, e são divididos em dois tipos, aqueles ligados ao peptidoglicano e aqueles intimamente ligados a lipídeos da membrana plasmática, chamados de ácidos lipotecóicos.

Os ácidos tecóicos tem como função (1) facilitar a ligação e regulação de entrada de cátions na bactéria; (2) regular a atividade de enzimas (autolisinas) que atuam sobre o peptidoglicano permitindo a inserção de novas unidades no processo de divisão celular; (3) constituir sítios ligadores de bacteriófagos; (4) servir de sítio de ligação com o epitélio do hospedeiro e (5) constituir importantes antígenos celulares (Neuhaus e Baddiley, 2003).

O esporo 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. Na esporulação bacteriana, à MET, observa-se inicialmente um isolamento de pequena porção do citoplasma (contendo cromossomo, ribossomo e

enzimas) por crescimento da membrana plasmática. Então, camadas de peptidoglicano são sintetizadas entre as membranas, seguida da eliminação de água e formada, exteriormente a essa estrutura, uma capa de proteínas. 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 (Trabulsi e Alterthum, 2004).

1.2.2.2 Parede celular de bactérias gram-negativas

A parede das bactérias gram-negativas é formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa, separadas pelo espaço periplasmático (ocupado pelo periplasma) (Fig. 3). O peptidoglicano de bactérias gram-negativas, em menor concentração quando comparado a bactérias gram-positivas, possui ligações peptídicas entre diferentes aminoácidos de NAM e NAG. Como consequência, as bactérias gram-negativas são mais suscetíveis a quebras que bactérias gram-positivas (Prescott, Harley e Donald, 2002).

A membrana externa de bactérias gram-negativas, assim como a membrana plasmática, é formada por uma bicamada lipídica, sendo a camada interna composta basicamente por fosfolípidios, e a externa por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas (Silhavy, Kahne e Walker, 2010). Os lipopolissacarídeos são responsáveis pelas características antigênicas de algumas bactérias, sendo chamados de endotoxinas (Benson, 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) (Benson, 1998).

A membrana externa pode produzir vesículas que são secretadas ao meio exterior. Estas vesículas podem conter porções do periplasma, parede celular, LPS, fosfolípidios, moléculas de comunicação célula-célula, autolisinas e possivelmente podem conter componentes citoplasmáticos incluindo o DNA (Kulp e Kuehn, 2010).

Em bactérias aquáticas, estas vesículas podem conter (1) enzimas endereçadas à lise de outras bactérias (Thompson, Naidu e Pestka, 1985), (2) substâncias que auxiliam na formação de biofilmes (Schooling e Beveridge, 2006), (3) na aquisição de nutrientes, (4) na inibição de compostos tóxicos do meio e (5) na resistência à lise viral (Kulp e Kuehn, 2010).

O espaço periplasmático, além de composto pelo peptidoglicano, contém algumas enzimas e proteínas, como enzimas hidrolíticas responsáveis pela quebra de macromoléculas impermeáveis à membrana, enzimas capazes de inativar drogas e proteínas transportadoras que atuam no transporte, e quimiotaxia de aminoácidos e açúcares (Fig.3) (Trabulsi e Alterthum, 2004).

1.2.3 Estruturas Capsulares

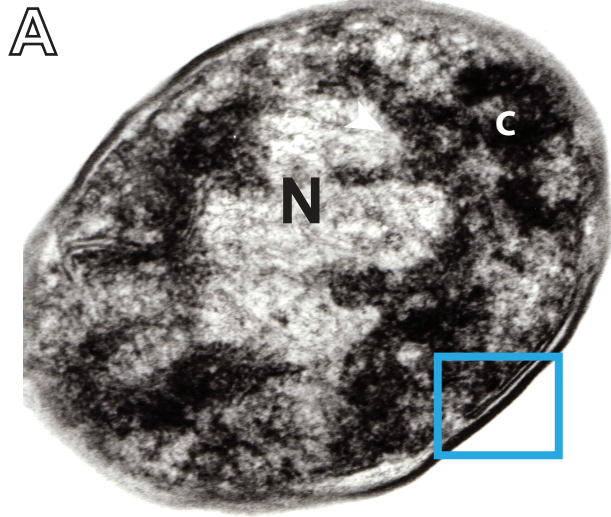
Vários procariotos sintetizam uma gama de substâncias poliméricas extracelulares compostas de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e outras macromoléculas biológicas (Wingender, Neu e Flemming, 1999), chamadas de substâncias poliméricas extracelulares (SPE).

A camada de SPE que é depositada na superfície da célula e fica ligada à parede celular (Fig.3) forma um revestimento externo e observada como uma camada bem definida, recebe o nome de cápsula. Porém quando esses polímeros formam uma massa amorfa mais dispersa, e parcialmente desligada da membrana, é chamado de camada mucosa (Beveridge e Graham, 1991).

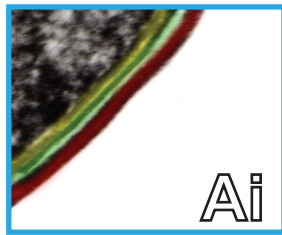
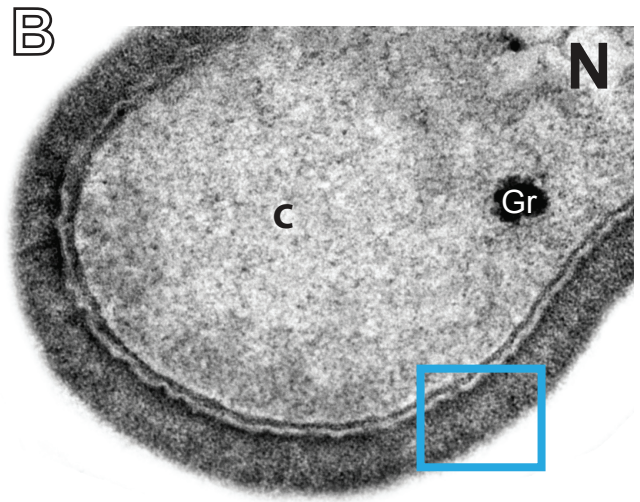
Cápsula e camada mucosa, em sua maioria de origem polissacarídica, são importantes reservatórios de água e nutrientes, uma vez que são formadas por macromoléculas muito hidratadas, servindo contra dessecação do meio. Bactérias encapsuladas são escorregadias e escapam da ação de predadores, aumentando a capacidade invasiva. Nestas estruturas capsulares são encontrados receptores específicos que servem como sítios de ligação com outras espécies e de formação de biofilmes, além de proporcionarem capacidade infectante em algumas bactérias (Nichols, Guezennec e Bowman, 2005; Stukalov *et al.*, 2008).

A membrana plasmática, parede celular e estruturas capsulares formam a estrutura conhecida como, envoltório celular que protege e permite adaptação das bactérias nos mais diferentes meios (Silhavy, Kahne e Walker, 2010). Heissenberger, Leppard e Herndl (1996) relacionaram a integridade de estruturas internas e espessura de estruturas capsulares, com nível de atividade e viabilidade em bactérias aquáticas.

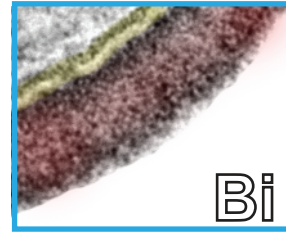
Bactéria Gram- Negativa



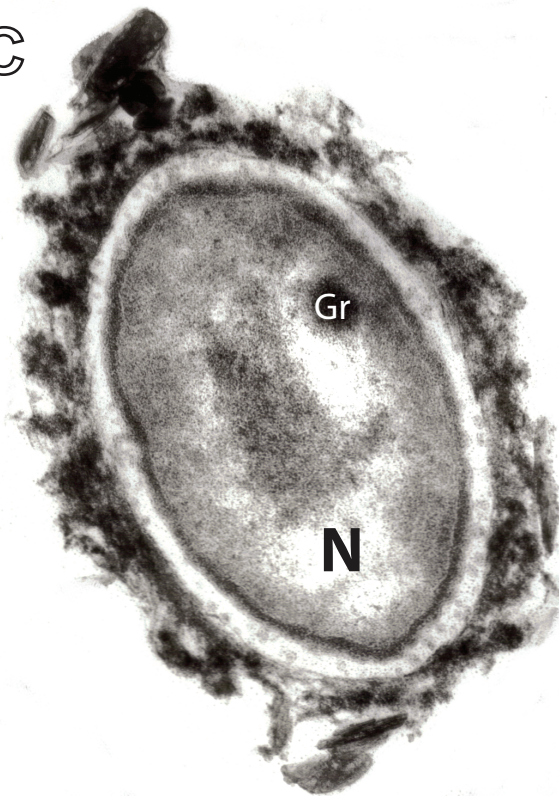
Bactéria Gram- Positiva



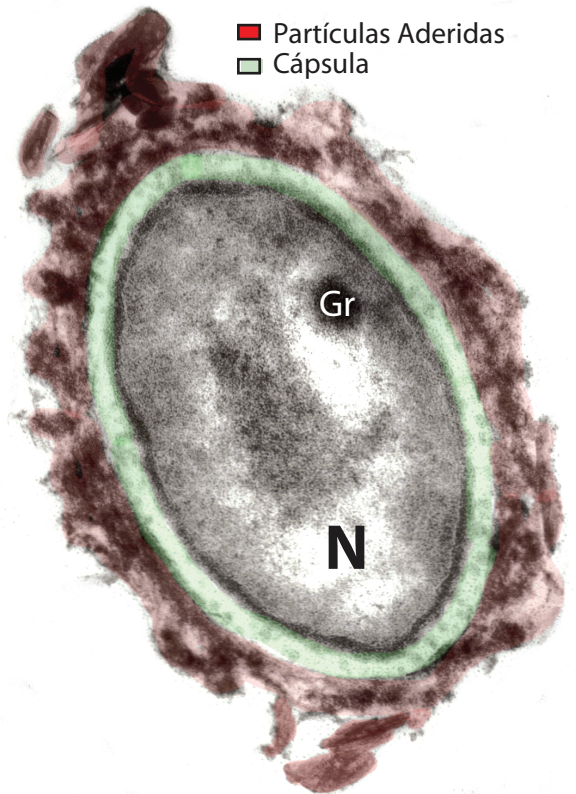
- Membrana Plasmática
- Espaço Periplasmático
- Parede celular



C



Ci



- Partículas Aderidas
- Cápsula

FIGURA 3: Ultraestrutura de bactérias aquáticas. (A-C) Bactéria com estruturas típicas como nucleóide (N), grânulo (Gr) e envoltórios celulares mostrando diferentes espessuras e composição (retângulos azuis). Em (Ai), em maior aumento, nota-se envoltório gram-negativo composto por parede celular, espaço periplasmático e membrana plasmática, enquanto em (Bi) observa-se envoltório celular gram-positivo com membrana plasmática e parede celular espessa. Note que o citoplasma das duas bactérias apresenta elétrondensidades distintas. Em C, observe bactéria apresentando estrutura capsular (marcada em verde em Ci) formando um conjunto com camada de partículas do substrato aderidas (marcada em vermelho em Ci). Adaptado de Silva *et al.* (2013). Barra, (A) 240 nm; (B) 90 nm; (Ai) 180 nm; (Bi) 45 nm e (C, Ci) 130nm.

1.2.4 Estruturas Citoplasmáticas

O citoplasma bacteriano é uma solução aquosa onde se encontram diversas estruturas.

1.2.4.1 Ribossomos

Os ribossomos encontrados nas bactérias possuem a mesma função dos encontrados em células eucarióticas (Prescott, Harley e Donald, 2002).

1.2.4.2 Grânulos

Uma diversidade de grânulos citoplasmáticos, também chamados de inclusões citoplasmáticas, é encontrada em bactérias (Shively, 1974). A natureza química destas estruturas varia entre bactérias, mas a sua função é quase sempre de reserva de substâncias e subunidades de macromoléculas para compor outras estruturas celulares (Trabulsi e Alterthum, 2004), mas também auxiliam na pressão osmótica, uma vez que suas moléculas ficam em sua forma particulada.

Segundo Prescott, Harley e Donald (2002), os grânulos mais comuns encontradas em procariotos são compostos por glicogênio, poli- β -hidroxibutírico (PHB) e por polihidroxialcanoatos (PHA) (polifosfatos), porém alguns gêneros podem acumular lipídeos neutros como trigliceróis (TAG). A deposição de grânulos de PHA em bactérias normalmente ocorre em resposta a um excesso de substrato carbônico e deficiência de outros nutrientes (Anderson e Dawes, 1990; Steinbuchel *et al.*, 1995).

1.2.4.3 Corpúsculos lipídicos

Moléculas de PHA e TAG são estocadas em bactérias em corpúsculos lipídicos, conhecidos como inclusões lipídicas ou gotas lipídicas. Os corpúsculos lipídicos bacterianos consistem em gotas arredondadas, constituídas de um núcleo hidrofóbico de PHA ou TAG, delimitada por uma monocamada de fosfolipídeos e proteínas distintas (fasinas) (Murphy, 2012).

Estas estruturas encontram-se presentes em todos os organismos eucariotos, comportando-se como organela dinâmica ricas em triglicerídeos e colesterol, cercadas por camada única de fosfolipídeos. Desempenham variadas funções fisiológicas em diferentes tipos celulares, possuindo um importante papel nas células inflamatórias (Melo *et al.*, 2011). Em bactérias, os corpúsculos lipídicos desempenham papéis importantes no metabolismo de lipídeos (Murphy, 2012).

1.2.4.4 Vacúolos gasosos

Os vacúolos gasosos são encontrados no citoplasma de organismos procarióticos que vivem flutuando em lagos e mares. A membrana destes vacúolos não é constituída como a maioria das membranas biológicas, sendo composta apenas de unidades repetidas de proteínas, organizada de maneira a formar uma estrutura rígida somente permeável a gases. A rigidez e o tamanho da vesícula parecem estar relacionados com a pressão osmótica e hidrostática que a bactéria se encontra (Prescott, Harley e Donald, 2002).

1.2.4.5 Citoesqueleto

As células bacterianas tem uma organização complexa sub-celular estabelecida e mantida por um conjunto diverso de proteínas polimerizadoras que formam o citoesqueleto bacteriano. No citoesqueleto bacteriano foram identificados pelo menos três classes gerais de polímeros dinâmicos: proteínas com homologia com a actina (MreB, ParM, AlfA, MamK e Fst), a tubulina (FtsZ, BtubA/BtubB TubZ e RepX), e os membros da família do ParA/MinD. Estes elementos proteicos que compõem o citoesqueleto bacteriano participam de muitos processos, incluindo a divisão celular, a

manutenção da forma de células, posicionamento de compartimentos bacterianos, replicação de plasmídeos e segregação de DNA (Cabeen e Jacobs-Wagner, 2005; Shih e Rothfield, 2006; Pogliano, 2008).

1.2.4.6 Nucleoide

O DNA bacteriano é encontrado em uma região irregular denominada nucleoide (Fig. 3). Esta região é preenchida por fitas dupla-hélice de ácido desoxiribonucleico (DNA) na forma de uma única molécula desdobrada. A carga negativa do DNA é neutralizada por poliaminas pequenas ou íons de magnésio. Com auxílio da MET, pode-se observar que o DNA bacteriano não é delimitado por envoltório nuclear, aparelho mitótico, em contato com a membrana plasmática ou mesossomos (Prescott, Harley e Donald, 2002; Eltsov e Zuber, 2006). Ainda existem no citoplasma bacteriano, em números variados, moléculas circulares de DNA, chamadas plasmídeo, onde seus genes não determinam características essenciais, mas muitas vezes conferem vantagens seletivas que às bactérias que os possuem (Trabulsi e Alterthum, 2004).

1.2.4.7 Tilacóides

Bactérias fotossintéticas, nitrificantes e cianobactérias podem apresentar áreas extensas de membranas intracitoplasmáticas, denominadas tilacóides, com diversas morfologias, como tubulares, vesiculares e lamelares. Os tilacoides têm a função de aumentar a área de superfície para ocorrência de processos metabólicos, principalmente reações enzimáticas como a fotossíntese (Yurkov e Beatty, 1998).

Dados recente do Grupo demonstraram que os tilacóides pode ser afetados pela irradiação ultravioleta (UV) em cianobactérias *Cylindrospermopsis raciborskii* (Noyma, Melo e Roland, 2009). Demonstrou-se que a irradiação UV é fator causador de morte e alterações ultraestruturais que incluem a perda de integridade do envoltório celular e diminuição da área ocupada por tilacóides (Peak e Peak, 1986; Diffey, 1991; Hadera *et al.*, 1998; Maranger, Del Giorgio e Bird, 2002; Singh, Häder e Sinha, 2010).

1.2.4.8 Apêndices locomotores

Grupos de bactérias apresentam várias maneiras de mobilidades, porém algumas são imóveis locomovendo-se de acordo com o fluxo de propulsão do meio onde se encontram. Bactérias móveis possuem apêndices locomotores localizados na face externa da membrana plasmática e na parede celular (Benson, 1998). O flagelo bacteriano é formado por uma estrutura basal, um gancho e um longo filamento externo à membrana, composto pela proteína flagelina. O comprimento do flagelo é geralmente maior que da célula, mas seu diminuto diâmetro mede cerca de 20nm, caracterizando uma estrutura delgada, mas relativamente rígida. A localização e o número de flagelos são utilizados na classificação das bactérias em certos grupos taxinômicos (Trabulsi e Alterthum, 2004).

Muitas bactérias gram-negativas são dotadas de apêndices proteicos filamentosos, mais curtos e mais numerosos que o flagelo que não formam ondas regulares, chamados de fímbrias. Estas não desempenham papel comprovado relativo à mobilidade, pois são encontradas em espécies móveis e imóveis, porém desempenham uma função conhecida na conjugação bacteriana, conduzindo o material genético. Esta fímbria é denominada fímbria sexual. As fímbrias também funcionam como sítios receptores de bacteriófagos e auxiliam na aderência à superfícies (Trabulsi e Alterthum, 2004).

1.2.4.9 Partículas virais

Outra observação frequente na análise ultraestrutural de bactérias é a presença de partículas virais. Os vírus são as menores entidades biológicas conhecidas e parasitas intracelulares obrigatórios, que podem infectar células procarióticas e eucarióticas. Twort (1915), mesmo sem conhecer o agente causador, descreveu a ação lítica de vírus em colônias de estafilococos. d'Herelle, em 1922, isolou e caracterizou como parasita ultramicroscópico de bactérias, dando o nome de bacteriófagos (Ackermann, 2011).

A estrutura dos bacteriófagos (vírus infectam as bactérias e utilizam a maquinaria celular para multiplicar o próprio material genético) é biologicamente simples, composta basicamente por um ácido nucléico (DNA ou RNA- ácido ribonucléico) com fita simples ou dupla, envolto por uma cápsula proteica (capsídeo), e uma cauda,

presente na maioria dos tipos virais, pela qual eles adsorvem para a célula hospedeira (Bradley, 1967).

Em ambientes aquáticos, os vírus podem existir em duas fases: extracelular e intracelular. Na fase extracelular, vivem livres e independentes de hospedeiro enquanto na fase intracelular, podem apresentar dois ciclos reprodutivos, o lítico e o lisogênico. No ciclo lisogênico, o genoma viral adsorvido passa a fazer parte do genoma da bactéria e acompanha o desenvolvimento e duplicação, não havendo a ruptura celular. Já no ciclo lítico, após a adsorção viral do seu material genético, este se apropria da maquinaria bacteriana produzindo novo material genético e proteínas virais que serão liberados para meio através do rompimento da membrana celular (Trabulsi e Alterthum, 2004). Quando em um ciclo lisogênico há uma perturbação na célula hospedeira, esta pode induzir a mudança deste ciclo para o lítico (Weinbauer, 2004).

Os vírus são membros abundantes e dinâmicos de sistemas aquáticos (Børsheim, Bratbak e Heldal, 1990b; Fuhrman, 1999). Grande parte do fluxo de matérias e energia da cadeia trófica passa pelos vírus, por meio de matéria orgânica dissolvida (MOD) (Proctor e Fuhrman, 1990). A destruição de grande número de microrganismos mediada por vírus tem várias implicações para os sistemas aquáticos, incluindo os efeitos sobre o tamanho da população e a diversidade, a transferência de material genético entre os organismos, reciclagem de nutrientes e carbono através da lise de organismos planctônicos e ciclagem energética. Desta forma, os vírus atuam na mortalidade de 40% da comunidade bacteriana (Fuhrman e Azam, 1980; Wilhelm e Suttle, 1999).

Trabalho realizado recentemente, utilizando técnicas de quantificação viral demonstrou que em ecossistemas aquáticos tropicais, a maioria dos vírus são bacteriófagos e sua abundância é controlada pela disponibilidade de bactérias hospedeiras específicas, que por sua vez, são reguladas por outros fatores ambientais, como disponibilidade de nutrientes e qualidade de substrato (Barros *et al.*, 2010).

1.3 MORTE BACTERIANA EM ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS

A morte é uma parte da vida, e para bactérias essa prerrogativa não é diferente.. A mortalidade é referida como um processo de perda funcional e morfológica da integridade da bactéria, incluindo lise e destruição do material genético (Servais, Billen e Rego, 1985). Fatores regulatórios da mortalidade em bactérias aquáticas de vida livre

esta em maior parte relacionada à predação, disponibilidade de nutrientes, infecção viral e vários tipos de estresse ambiental (Coveney e Wetzel, 1988).

A mortalidade regula a abundância e produção secundária bacteriana nos ecossistemas aquáticos, mantendo-a aparentemente constante, onde há um equilíbrio entre alta taxa de crescimento com alta taxa de mortalidade (Grossart, 2010). Este equilíbrio é ilustrado com a disponibilidade compostos celulares resultantes da degradação de bactérias mortas sendo incorporados ao COD, que favorecerá no crescimento da população bacteriana (Fuhrman, 1999). A morte bacteriana tem, assim, o importante significado na ciclagem de nutrientes nos sistemas aquáticos (Lindeman, 1942).

Estudos do ponto de vista ecológico em ecossistemas aquáticos relacionam a morte bacteriana com a viabilidade celular. Smith e Del Giorgio (2003) propõem que a viabilidade seja uma visão contínua de estados fisiológicos, não restringindo os estados fisiológicos em ativos e inativos. Do ponto de vista ecológico, podem ser definidos de acordo com a viabilidade: bactérias ativas respirando, responsáveis pela produção e participação ativa de ciclos geoquímicos; bactérias vivas com parede celular intacta, que mantêm seu metabolismo completo, e bactérias mortas (Choi, Sherr e Sheer, 1999).

A heterogeneidade em ecossistemas aquáticos pode conduzir as bactérias a se adaptarem fisiologicamente a estas mudanças para maximizar seu crescimento e sobrevivência. Uma característica fundamental das células é sua habilidade de regular o crescimento em respostas a mudanças ambientais. Algumas espécies bacterianas são extremamente adaptadas para a sobrevivência a longo prazo. Os fatores de inativação ou ativação são conduzidos pelo crescimento ambiental. Fatores físicos modelam o sistema global favorecendo certos grupos de bactérias. Fatores químicos são determinantes na base alimentar. Fatores biológicos funcionam mais como fatores de abundância decrescente de competição de recursos (Ducklow, 2000).

A integridade de membrana plasmática é um aspecto da estrutura e fisiologia celular, sendo o melhor critério para distinguir entre bactérias vivas e mortas, pois células com dano na membrana não podem sustentar um gradiente eletroquímico e não estão aptas ao crescimento (reprodução). Nas bactérias, a membrana plasmática possui um papel importante, pois está ligada a diversos processos celulares (transporte de solutos, atividade respiratória, barreira permeável, funções enzimáticas). Desta forma, a

perda da integridade da membrana plasmática afeta diretamente todos estes processos (Joux e Lebaron, 2000).

A detecção da integridade de membrana é baseada na capacidade das células excluírem vários compostos químicos (como corantes fluorescentes), quando usados em baixas concentrações, que não passariam através de membranas intactas. Células com membranas danificadas são consideradas mortas e podem ser detectadas antes de sua lise (Joux e Lebaron, 2000). Outros parâmetros morfológicos podem ser utilizados para caracterizar morte ou inativação bacteriana, como a ausência de conteúdo celular (Heissenberger, Leppard e Herndl, 1996).

Estudos sobre a morte bacteriana em ecossistemas aquáticos vêm sido realizados com a finalidade de melhor entendimento dos mecanismos de morte e como podem contribuir na dinâmica e ecologia de bactérias aquáticas (Lewis, 2000; Smith e Del Giorgio, 2003; Engelberg-Kulka *et al.*, 2006). Trabalho recente do Grupo, mostrou que a morte celular programada pode ocorrer em bactérias aquáticas de vida livre, indicando que a morte celular bacteriana é muito mais complexa e pode envolver mecanismos mais elaborados, semelhantes aos já descritos em células eucarióticas (Silva, 2012).

1.4 RADIAÇÃO SOLAR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.4.1 Radiação Ultravioleta e Camada de Ozônio

A exposição ambiental à radiação solar tem sido uma parte integral da evolução de muitas espécies e comunidades de organismos terrestres e aquáticos, fornecendo energia para a fotossíntese e calor. Cerca de metade desta energia é emitida como luz visível e o restante, no comprimento do infravermelho e radiação ultravioleta. Apenas 9% da radiação que atinge a Terra (Anderson, 1981) corresponde à região ultravioleta do espectro electromagnético, e pode ser dividida em três gamas denominadas: UV-A (400-320 nm), UV-B (320-280 nm) e UV-C (280-100 nm) (Henderson, 1977).

Comprimentos de onda mais curtos, na faixa UV-C, dificilmente atingem a superfície da Terra, exceto em grandes altitudes, sendo quase completamente absorvida pela camada de ozônio e, portanto, têm pouco significado biológico. Já a radiação no espectro UV-B pode penetrar na camada de ozônio na estratosfera. Com diminuição da coluna de ozônio na atmosfera, há um aumento na incidência de radiação solar UV-B

que atinge a superfície terrestre. UV-B é a radiação componente mais energética da luz solar, causando efeitos profundos sobre plantas, microorganismos, materiais e qualidade do ar, enquanto a radiação UV-A, penetra na camada de ozônio da estratosfera, permanecendo inalterada (Henderson, 1977).

O ozônio (O_3) é um gás naturalmente presente na estratosfera, e altamente reativo. Este gás não é uniformemente distribuído ao longo do globo e, em geral, as concentrações são mais elevadas em médias e altas latitudes e, mais baixas, próximas ao equador. A diferença é causada por ventos estratosféricos, pela produção química e destruição natural do ozônio (Diffey, 2003). A formação do ozônio se dá pela dissociação de oxigênio molecular (O_2), através de radiação ultravioleta UV (242nm), em oxigênio atômico ($1/2 O_2$). Este, por sua vez, reage com O_2 criando O_3 , uma molécula instável que, após absorção de radiação ultravioleta, no comprimento de onda de cerca 320nm, é dividido em oxigênio atômico e oxigênio molecular (Fig. 4). É essa dissociação de O_3 pela radiação ultravioleta que impede que parte desta radiação atinja a superfície terrestre (Chapman, 1930).

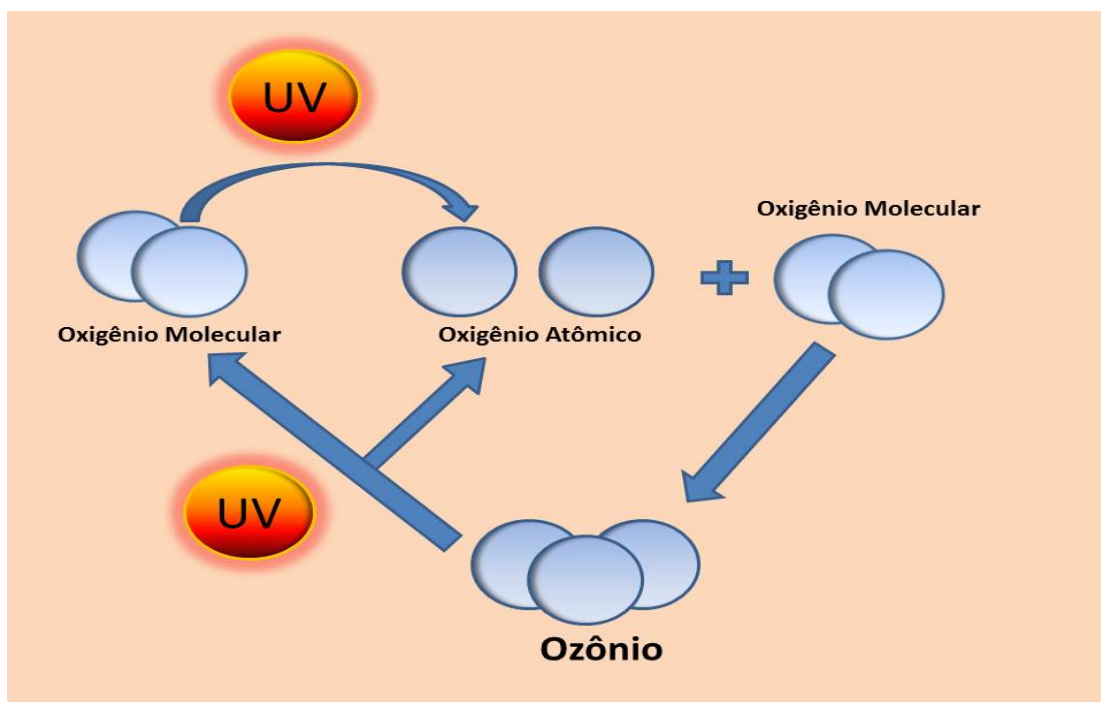


Figura 4: Esquema de formação e dissociação de moléculas de ozônio por radiação ultravioleta adaptado de (Chapman, 1930).

No início dos anos 1970, pesquisas associaram clorofluorcarbonos (CFCs) com a depleção do ozônio estratosférico, afirmando que os CFCs difundidos para a estratosfera, onde são quebrados por radiação ultravioleta, liberam cloro que reage cataliticamente com ozônio, levando à sua destruição (Molina e Rowland, 1974). Apenas com a descoberta de uma redução significativa na concentração da coluna de ozônio, sobre a Antártida, em 1985, a preocupação pública sobre destruição do ozônio surgiu. A descoberta do buraco de ozônio, inicialmente, levou à investigações dos impactos da ultravioleta sobre o fitoplâncton, devido sua importância na produção primária. No entanto, conclusões posteriores, indicaram que a radiação ultravioleta também exerce um impacto significativo sobre a alça microbiana, que está na base da rede trófica aquática, além de níveis tróficos superiores (Webb *et al.*, 2003).

1.4.2 Fotobiologia Celular

A radiação ultravioleta pode provocar vários efeitos diferentes sobre as espécies biológicas, a maioria deles não letal para as células, dependendo da absorção dos fótons na faixa ultravioleta por moléculas importantes, os ácidos nucléicos mais notavelmente, e a um menor grau, as proteínas e outras moléculas (Danos, 1980). A energia absorvida por uma estrutura química qualquer pode provocar basicamente quatro tipos de alteração molecular: rotação, vibração, excitação eletrônica e quebra de ligação ou ionização. O mecanismo seguido dependerá sobre tudo do comprimento de onda da fonte irradiante e da configuração energética da ligação atingida (Häder e Sinha, 2005).

Os danos da radiação para o DNA são potencialmente perigosos, mesmo a incidência de um único fóton em uma única molécula pode ter efeitos potencialmente letais. Danos no DNA também podem ser consequência de radicais livres e espécies reativas de oxigênio formadas em vários processos fotoquímicos (Mitchell e Karentz, 1993).

Os ácidos nucléicos apresentam uma absorção máxima entre 260-265nm, devido a bases de nucleotídeos serem os cromóforos naturais. Após a absorção de radiação ultravioleta por DNA, os fotoprodutos resultantes são derivados de pirimidina (Errera, 1952), incluindo o tipo de dímero ciclobutil (dímeros de pirimidociclobutano também chamados, CPDs, que são os mais importantes), pares de pirimidina, hidratos de pirimidina e ligações cruzadas de proteínas do DNA (Häder e Sinha, 2005).

A ultravioleta absorvida promove a formação de ligações entre nucleotídeos adjacentes, que são criadas moléculas de pares ou dímeros (Fig.5). A formação de dímeros de tiamina-tiamina é mais comum, ocorrendo também dímeros de citosina-citosina, timina, citosina e uracila de dimerização. A formação de um número suficiente de dímeros na bactéria impede que se replica o seu DNA ou RNA, impedindo a reprodução (Jagger, 1981).

As proteínas também absorvem mais fortemente nas regiões UV-B e UV-C, embora a sua absorbância é menor do que a dos ácidos nucléicos. Existem outras moléculas com a capacidade de absorver a radiação ultravioleta como porfirinas, carotenóides e quinonas (Diffey, 1991).

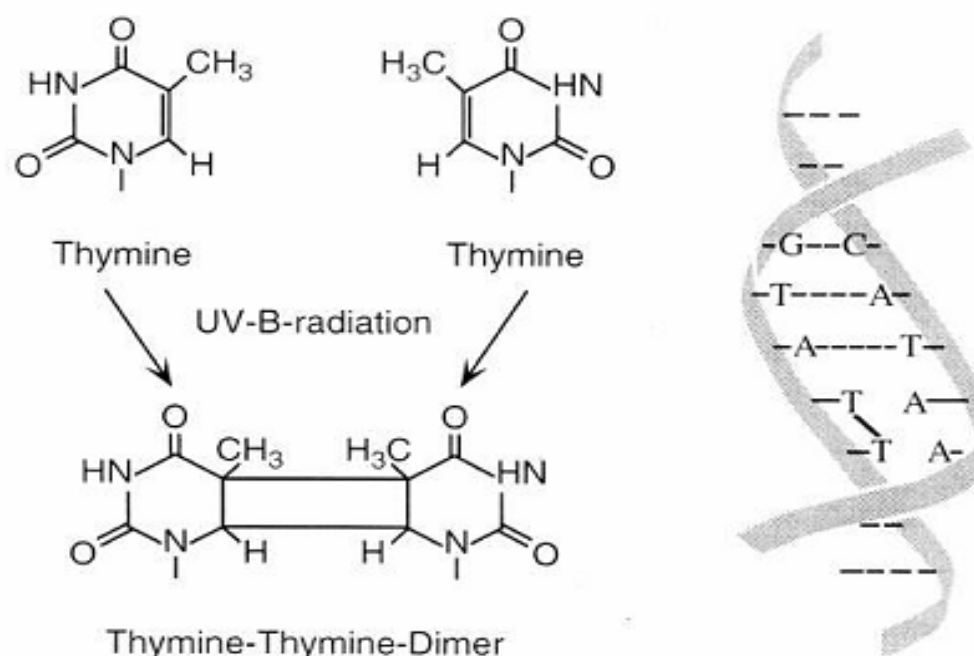


Figura 5: Formação de dímero de timina no DNA, através da quebra das ligações de hidrogênio entre os pares de base timina por fótons de UV-B. Extraído de Rozema et al (2002).

1.4.3 Efeitos da Radiação Ultravioleta sobre os Ecossistemas Aquáticos

Ecossistemas aquáticos são os principais componentes da biosfera da Terra, responsável pela produção de mais de 50% da biomassa sobre o nosso planeta, e incorporam aproximadamente a mesma quantidade de dióxido de carbono atmosférico

como ecossistemas terrestres (Zepp *et al.*, 2007) . Por isso, é crucial a avaliação de como uma maior exposição à radiação solar ultravioleta pode afetar a produtividade dos sistemas aquáticos.

A radiação de curto comprimento de onda solar pode atingir profundidades ecologicamente significativas em água doce e em muitos ecossistemas marinhos (Häder, 1997). Desta forma, a depleção dos níveis de ozônio resulta em aumento na quantidade de radiação UV-B solar que penetra no interior da zona eufótica, onde a produtividade do fitoplâncton ocorre. Além disso, a depleção de ozônio também tem sido demonstrada alterando a relação UV-B: UV-A: rádio PAR (radiação fotossinteticamente ativa), potencialmente prejudicando a luz nos processos dependentes em organismos aquáticos, que incluem a fotossíntese, foto-orientação, photoinibição e fotoproteção, resultando em uma tensão significativa para os diversos ecossistemas aquáticos (Häder, 1997).

1.4.4 Efeitos da Radiação Ultravioleta sobre Comunidade Bacteriana Aquática

As comunidades de plânctons pelágicos funcionam através de uma rede de intercâmbio de energia e nutrientes mediados por um diversificado leque de produtores e consumidores, o que depende, em última análise, da energia fornecida pelo sol. As bactérias são componentes cruciais da teia alimentar microbiana, desempenhando um papel fundamental na ciclagem de nutrientes, e constituindo uma das principais vias de fluxo de carbono em ecossistemas aquáticos. Elas contribuem até 40% do carbono plânctônico (Cho e Azam, 1990), processam até 80% da produção primária (Azam *et al.*, 1983; Cho e Azam, 1990) e apresentam potenciais de absorção de nutrientes em torno de 100 vezes mais rápida do que a do fitoplâncton (Blackburn, Fenchel e Mitchell, 1998). Bacterioplâncton também consome matéria orgânica dissolvida (DOM) para formar biomassa bacteriana, assim ocorre a reciclagem de carbono, e tornando disponível a níveis tróficos superiores (Pomeroy *et al.*, 2007). No entanto, muito pouco se sabe sobre o papel dos raios ultravioleta sobre os componentes microheterotróficos das teias alimentares aquáticas, apesar da sua importância para o carbono e o fluxo de energia através da alça microbiana (Azam *et al.*, 1983).

Potencialmente, a radiação solar pode induzir mudanças na composição da comunidade bacteriana devido a diversos mecanismos diretos e indiretos: (i) efeitos prejudiciais diretos da radiação ultravioleta sobre a atividade bacteriana e de

sobrevivência, como danos no DNA e danos associados à produção fotoquímica de radicais livres (Jeffrey *et al.*, 1996); (ii) a seleção de bactérias fototróficas, os grupos dominantes de bactérias no oceano possuem capacidade fotoreguladora que pode dar uma vantagem em condições iluminadas pelo sol (iii) efeitos indiretos devido à mudanças na composição do fitoplâncton e da biomassa, como após a floração do fitoplâncton (Herndl, Müller-Niklas e Frick, 1993; Müller-Niklas *et al.*, 1995; Wilhelm *et al.*, 2003). Desta forma, variações no regime de luz que afetam o fitoplâncton também influenciam a composição da comunidade bacteriana indiretamente. A radiação ultravioleta também pode afetar a bacterivoria por nanoflagelados heterotróficos (Sommaruga, 2001), desencadear o ciclo lítico de bacteriófagos lisogênicos (Maranger, Del Giorgio e Bird, 2002), e a alterar da biodisponibilidade do carbono orgânico dissolvido (DOC) (Zepp, Callaghan e Erickson, 1995; Suhett *et al.*, 2009). A sensibilidade das comunidades bacterianas de superfície foi descrita semelhante a de águas profundas, sugerindo que comunidades bacterianas não apresentam aumento da resistência à exposição solar (Herndl, Muller-Niklas e Frick, 1993).

1.4.5 Efeitos da Radiação Ultravioleta sobre a Estrutura Bacteriana

Tem sido sugerido que as bactérias heterotróficas são mais susceptíveis ao stress da radiação UV do que organismos maiores, pois apresentam genomas haplóides simples com pouca ou nenhuma redundância funcional (não possuem genes que produzem o mesmo aminoácido), além do seu pequeno porte, tempo de geração curto e falta de pigmentos de absorção de ultravioleta (Karentz, 1994). Isto resulta num aumento da sensibilidade do bacterioplâncton ao stress da radiação ultravioleta, principalmente UV-B, comparativamente com os organismos eucarióticos maiores produzindo, após exposição, cerca do dobro da quantidade de dímeros de timina (Jeffrey *et al.*, 1996). Assim, o tamanho do organismo pode estar inversamente correlacionado com a extensão do dano induzido pela ultravioleta que recebe.

A radiação ultravioleta pode causar efeitos diretos e indiretos sobre bacterioplâncton. Os efeitos diretos surgem de danos de macromoléculas celulares como resultado da absorção direta da radiação ultravioleta, especialmente pelo DNA. O comprimento de onda e da intensidade da exposição determina o tipo e a extensão de dano no DNA. UV-A causa geralmente danos indiretos ao DNA, como resultado da

formação de intermediários químicos, como os radicais de hidroxila que interagem com DNA para formar quebras de fita, sítos alcalinos e ligações cruzadas das proteínas do DNA (Peak e Peak, 1986). A consequência mais importante da absorção da radiação UV-B pelo DNA é a formação de fotoprodutos tais como pirimidina (6-4) pirimidona e dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs). A formação de fotoprodutos causa erros na replicação do DNA e transcrição de RNA (Karentz, 1994) e tem sido descrito em bacterioplâncton (Jeffrey *et al.*, 1996), assim como em protistas fagotróficos (Sommaruga, 2001; Montzka *et al.*, 2003). O CPD pode ser letal se ocorrer o bloqueio a síntese de DNA e transcrição do RNA, ou pode ser mutagênico se ignorada pela DNA polimerase (Sancar e Sancar, 1988).

Assim, a redução do DNA, da síntese proteica (Aas *et al.*, 1996), da atividade exoenzimática (Miiller-Niklas *et al.*, 1995), da captação de aminoácidos, do consumo de oxigênio (Pakulski *et al.*, 1998), e da abundância de bactérias (Miiller-Niklas *et al.*, 1995) indicam efeitos prejudiciais diretos da radiação ultravioleta. Segundo estudos realizados em águas antárticas, a viabilidade bacteriana, também sofre impacto pela exposição aos raios UV. Os estudos apontaram uma redução na viabilidade com base em unidades formadoras de colônias (UFC), de assembléias naturais bacterianas e isolados marinhos (Helbling *et al.*, 1995).

Os efeitos indiretos da radiação ultravioleta estão associados à biodisponibilidade de matérias orgânicas dissolvidas (MOD) pela ultravioleta (Lindell, Granéli e Tranvik, 1995) ou pela sensibilidade dos animais bacteriófagos à radiação ultravioleta (Sommaruga, 2001). A clivagem fotolítica do MOD pela ultravioleta produz vários compostos, alguns destes são ácidos orgânicos de baixo peso molecular que podem ser utilizados de forma eficiente pelo bacterioplâncton, melhorando a actividade bacteriana (Lindell, Granéli e Tranvik, 1995). Outros fotoprodutos, como os radicais livres, têm efeitos prejudiciais sobre os organismos planctônicos inbindo as atividades bacterianas (Aas *et al.*, 1996). Logo, o resultado da radiação ultravioleta sobre o metabolismo bacteriano é o equilíbrio entre e dos efeitos diretos e indiretos.

1.4.6 Mecanismos de Defesa contra Radiação Ultravioleta em Bactérias

Durante a evolução, organismos desenvolveram mecanismos de proteção e mitigação contra danos da radiação ultravioleta, com uma blindagem de radiação

(pigmentação), remoção de espécies de oxigênios tóxicos e desenvolvimento de sistemas de reparação a danos específicos (Sancar e Sancar, 1988). Fototaxia, respostas fotocinéticas, fotofóbicas (Häder e Sinha, 2005), migração vertical ou o comportamento de flutuação por meio de vacúolos gasosos (Bebout e Garcia-Pichel, 1995) são estratégias também desenvolvidas por organismos procariotos aquáticos a fim de evitar danos causados por radiação ultravioleta (Leech e Johnsen, 2003). A migração vertical permite a mudança de posição na coluna de água, com mudanças de condições ambientais assegurando quase um constante de ambiente externo. O acúmulo de enzimas desintoxicantes ou supressores de radicais e antioxidantes, como superóxido dismutase e peroxidases, podem também fornecer proteção aos danos causados por radicais prejudiciais ou de espécies de oxigênio reativos resultados do stress oxidativo causados pela UV-A e UV-B (Mittler e Tel-Or, 1991). Outros fatores, como a produção de polissacrídeos extracelulares, estão igualmente relacionados com esta proteção (Ehling-Schulz, Bilger e Scherer, 1997).

Em resposta aos danos da radiação ultravioleta, bactérias desenvolveram diferentes vias de reparação, incluindo a reparação fotoenzimática (PER), o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (também chamado “Dark Repair”), e a reparação recombinatória (reparação pós-replicação) (Yoder e Bushman, 2000). PER envolve a ligação de uma enzima fotorreativa (fotólise) à dímeros de pirimidina induzidos por radiação ultravioleta, no escuro e na presença de temperatura favorável. Após a exposição às radiações entre 330 e 660 nm (na faixa de luz ultravioleta), a enzima é ativada e separa o dímero, reparando o fotoproduto do DNA. Danos causados pela radiação ultravioleta e PER podem ser influenciados pelos movimentos passivos das bactérias dentro da coluna d’água, onde estes organismos são expostos alternadamente a níveis elevados de radiação, ou seja, a ultravioleta solar prejudicial perto da superfície e UV-A benéfico em profundidades maiores (Sancar e Sancar, 1988). A NER envolve a remoção enzimática da região com defeito em uma das duas fitas de DNA, com a substituição posterior por nucleotídeos normais através do emparelhamento de bases complementares (Yoder e Bushman, 2000). Os danos causados pela radiação UV-B ao DNA do bacterioplâncton são programados para serem reparados em um processo padrão de oscilação diurno (Jeffrey *et al.*, 1996), acumulando durante a tarde e sendo reparado entre o pôr e o nascer do sol seguinte, o que indica a presença de processos de reparação escuros ativos em bacterioplâncton naturais (Yoder e Bushman, 2000).

No reparo pós-replicação, são deixadas lacunas na fita de DNA oposta àquela onde ocorreram os CDPs. Essas lacunas são subsequentemente preenchidas por síntese de DNA. Reparação mutagênica reduz a fidelidade da DNA polimerase, permitindo contornar nucleotídeos danificados, o que pode resultar na incorporação de nucleotídeos inadequados na fita filha, resultando em mutações (Sancar e Sancar, 1988).

Vários genes presentes em microorganismos são regulados por radiação UV-B, e as mudanças no UV-B podem alterar a expressão genética com consequências potencialmente importantes (Jordan, 1996). Embora os mecanismos exatos envolvidos na percepção de UV-B radiação por organismos ainda não são bem compreendidos, o oxigênio ativo pode ser um dos gatilhos que podem alterar a atividade do gene. O gene RecA, é um componente essencial da resposta aos danos no DNA bacteriano, participando diretamente na reparação do DNA, e que regula a expressão de outros genes que promovem aumento da sobrevivência após danos. A expressão do gene RecA também é regulada pela radiação ultravioleta (Walker, 1984).

1.4.7 Fatores que Influenciam a Radiação Ultravioleta em Ambientes Aquáticos

A coluna da camada de ozônio vem sofrendo um esgotamento devido ao despejo antrópico de hidrocarbonetos halogenados, como clorofluorcarbonos, porém apresenta ciclos anuais e de longo prazo que influenciam na intensidade de energia da radiação solar ultravioleta que incide sobre os ecossistemas aquáticos e terrestres.

Cobertura de nuvens, poluição da troposfera por materiais particulados e ozônio antropogenicamente criado interferem na absorção de radiação ultravioleta solar, reduzindo intensidade, principalmente de raios UV-B que atingem a superfície da Terra (Wenny, Saxena e Frederick, 2001). Carbono orgânico dissolvido e particulado (COD e COP) são as principais substâncias atenuadoras em águas doce e marinha. O COD está principalmente envolvido na atenuação de radiação UV-B, enquanto o COP diminui a radiação UV-A na coluna de água (Bracchini *et al.*, 2004). Atenuação da radiação ultravioleta é muito variável em ambientes aquáticos. Devido à enxurrada de matéria orgânica e carbono orgânico dissolvido (COD) das margens, a transparência é menor em áreas costeiras e águas rasas da plataforma continental. Em ecossistemas de água doce, absorvância da radiação ultravioleta é geralmente elevada, devido à grande utilização de matéria orgânica em decomposição, e também pelo efeito da eutrofização

(Bracchini *et al.*, 2004). A lenta fotodegradação de COD na coluna de água pela radiação solar produz moléculas menores que são consumidos por bacterioplâncton (Klug, 2005). Como resultado, há o aumento da penetração de radiação ultravioleta na coluna de água (Hadera *et al.*, 1998).

Outros fatores também podem influenciar na penetração de raios UV nos ambientes aquáticos e conseqüente alteração na densidade bacteriana, como: (i) a densidade de fitoplâncton alterando distribuição vertical de bacterioplâncton, (ii) a formação de biofilmes (Prakash, Veeregowda e Krishnappa, 2003), e (iii) concentração de vírus (Wilhelm *et al.*, 2003).

1.4.8 Efeitos da Radiação Ultravioleta nas Teias Tróficas Aquáticas

O potencial de radiação ultravioleta em inibir tanto atividade do fitoplâncton e bacterioplâncton (Herndl, Müller-Niklas e Frick, 1993) e suas implicações ecológicas, bem como em induzir alterações no ciclo biogeoquímico, vem despertando interesse sobre os efeitos da radiação ultravioleta em processos químicos e biológicos.

O efeito da radiação ultravioleta na cadeia alimentar microbiana pode ser dependente, não só de efeitos diretos deletérios sobre os produtores primários e bactérias, mas também sobre os efeitos em níveis tróficos superiores (Hadera *et al.*, 1998). No entanto, um número limitado de estudos, que considerou simultaneamente diversos níveis de tróficos aquáticos, são contraditórios, tanto confirmando ou rejeitando a influência da radiação UV sobre a relação entre o predador e presa (Bothwell, Sherbot e Pollock, 1994; Chatila *et al.*, 2001). Trabalhos como de Bothwell, Sherbot e Pollock (1994) e de Sommaruga (2001) mostraram uma redução da atividades predadoras do fitoplâncton e bacterioplâncton sob efeito da radiação ultravioleta. No entanto, a radiação UV-B parece não ter efeito sobre microzooplâncton apesar do aumento de 10 vezes da radiação ultravioleta biologicamente prejudicial aplicada (Mostajir *et al.*, 1999).

1.4.9 Efeitos da Radiação Ultravioleta sobre Ciclo Biogeoquímicos Aquáticos

A biogeoquímica global controla processos de vida, clima e suas interações, incluindo efeitos sobre as concentrações de gases do efeito estufa na atmosfera, que pode ser afetado de várias formas por mudanças no ozônio estratosférico e, portanto, a radiação solar ultravioleta (Zepp, Callaghan e Erickson, 1995). A radiação UV influencia o ciclo do carbono, nitrogênio, enxofre e metais aquáticos, afetando, portanto, uma grande variedade dos processos de vida (Zepp *et al.*, 2007).

Modificações nos processos de ciclagem de carbono pela radiação ultravioleta, incluindo tanto a radiação UV-B e UV-A, são mediadas através de alterações na sua captura através da fotossíntese, armazenamento na biomassa e matéria orgânica particulada; e liberação, pela respiração e decomposição fotoquímica (Herndl, Müller-Niklas e Frick, 1993; Zepp, Callaghan e Erickson, 1995). Os efeitos da radiação ultravioleta sobre o ciclo do carbono estão também associados com os seus efeitos sobre o ciclo de metais e nutrientes minerais, tais como o azoto. Outros componentes da mudança do clima, incluindo aquecimento, elevado nível de dióxido de carbono e alterações nos padrões de precipitação, são processos que interagem com a radiação ultravioleta, e também podem afetar ciclos de carbono e nutrientes (Zepp, Callaghan e Erickson, 1995).

A radiação afeta o ciclo do nitrogênio de várias maneiras, incluindo efeitos no nitrogênio relacionados à atividade enzimática de microorganismos através de fotoinibição da fixação de nitrogênio (Hadera *et al.*, 1998) e indiretamente através de efeitos sobre a disponibilidade biológica de elementos essenciais vestigiais, tais como o ferro, que estimula o crescimento de fixadores de azoto. Alterações globais potenciais relacionadas com o aumento dos desmatamentos e modificações nos padrões de uso da terra irão causar provável aumento de corpos d'água, que, por sua vez, irá interagir com as mudanças climáticas aumentando a fotodegradação de carbono orgânico por radiação ultravioleta, permitindo uma maior penetração desta em sistemas aquáticos (Zepp, Callaghan e Erickson, 1995).

A ciclagem de fósforo também pode ser potencialmente afetada pela exposição aos raios ultravioleta, tendo em vista que a fotólise pela fosfatase húmica aumenta a ciclagem de fósforo em ambientes aquáticos (Espeland e Wetzel, 2001).

Os metais, especialmente o ferro e o cobre, desempenham um papel importante na camada superior do oceano e na biogeoquímica de água doce, através da participação em processos de UV-induzidos, que produzem e consomem peróxidos e outros oxidantes que participam nos processos biogeoquímicos, além de oligoelementos essenciais para plâncton (Barbeau *et al.*, 2001). Por isso, a radiação ultravioleta afeta a biodisponibilidade de outros metais em ecossistemas aquáticos, com o potencial de afetar toxicidade do metal e o crescimento do fitoplâncton e outros microorganismos que estão envolvidos na ciclagem de carbono e nitrogênio. Em geral, fotoreações, induzidas por ultravioleta, de complexos orgânicos com metais aumentam a sua disponibilidade biológica (Fig. 6).

O aumento resultante na transparência da água pode aumentar os efeitos da radiação ultravioleta sobre a biogeoquímica aquática na camada de superfície e coluna da água (Hadera *et al.*, 1998). As mudanças climáticas podem alterar a exposição dos ecossistemas à radiação ultravioleta, influenciando processos na Terra que afetam destruição do ozônio (Webb *et al.*, 2003). Interações entre a mudança de radiação ultravioleta solar e o clima também influenciam as trocas de gases, tais como halocarbonetos (por exemplo, brometo de metila). Estes gases, em seguida, influenciam de destruição do ozono e gases de enxofre para produzir aerossóis de sulfato (Hader *et al.*, 2007).

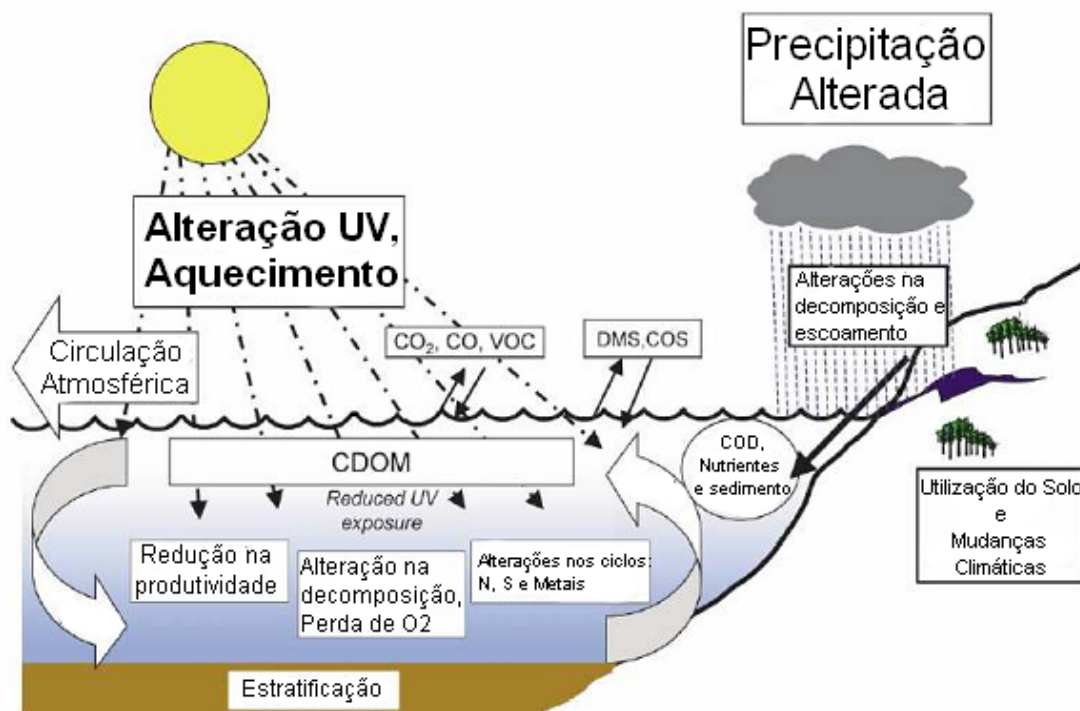


Figura 6: Ciclos biogeoquímicos aquáticos afetados pela radiação ultravioleta e sua interação com outras mudanças ambientais. DMS, dimetil sulfeto; CDOM ,matéria orgânica dissolvida colorida; DOC, carbono orgânico dissolvido.

Adaptado de Zepp *et al* (2003).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

Tendo em vista o papel de bactérias em ecossistemas aquáticos e a importância da radiação ultravioleta como um dos fatores que alteram a dinâmica destes ecossistemas, o presente trabalho teve como objetivo geral estabelecer um modelo de cultura de bactérias aquáticas de água doce e investigar a ação da radiação ultravioleta sobre a comunidade bacteriana cultivável.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma cultura de bactérias aquáticas no Laboratório de Biologia Celular na Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais;
- Estabelecer a curva de crescimento de bactérias cultiváveis, através de análise de densidade óptica e microscopia de fluorescência;
- Investigar a densidade bacteriana nas culturas submetidas à radiação ultravioleta por espectrofotometria e microscopia de fluorescência;
- Investigar a viabilidade celular de bactérias aquáticas em culturas sob ação da radiação ultravioleta, através do uso de marcador específico para integridade de membrana;
- Caracterizar a diversidade ultraestrutural de bactérias aquáticas cultiváveis;
- Investigar, por microscopia eletrônica de transmissão, a ocorrência de alterações celulares de bactérias aquáticas cultivadas submetidas à radiação ultravioleta;
- Contribuir para o entendimento da relação entre a radiação ultravioleta e bactérias de ecossistemas aquáticos tropicais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE COLETA E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

O reservatório da Usina Hidrelétrica de Funil encontra-se no Rio Paraíba do Sul situado nos municípios de Itatiaia e Resende, no Estado do Rio de Janeiro, nas coordenadas de $22^{\circ}35'S$ e $44^{\circ}35'W$ (Fig. 8). Este reservatório está inserido na Bacia Costeira de Sudeste, em uma região sujeita a intenso intemperismo químico, com relevo montanhoso, e condições de clima tropical quente e chuvoso durante o verão, e seco no inverno. O reservatório ocupa uma área de aproximadamente 40 km^2 com volume total de 890 milhões m^3 e possui nível máximo de operação de 466,50 m e mínimo de 444,00m com potência nominal de 216 MW. A construção do reservatório foi finalizada em 1969, com a função principal de gerar energia elétrica, mas é também responsável por regular a vazão do rio, atenuando o impacto de cheias nas cidades à jusante e abastecimento de água dessas cidades.

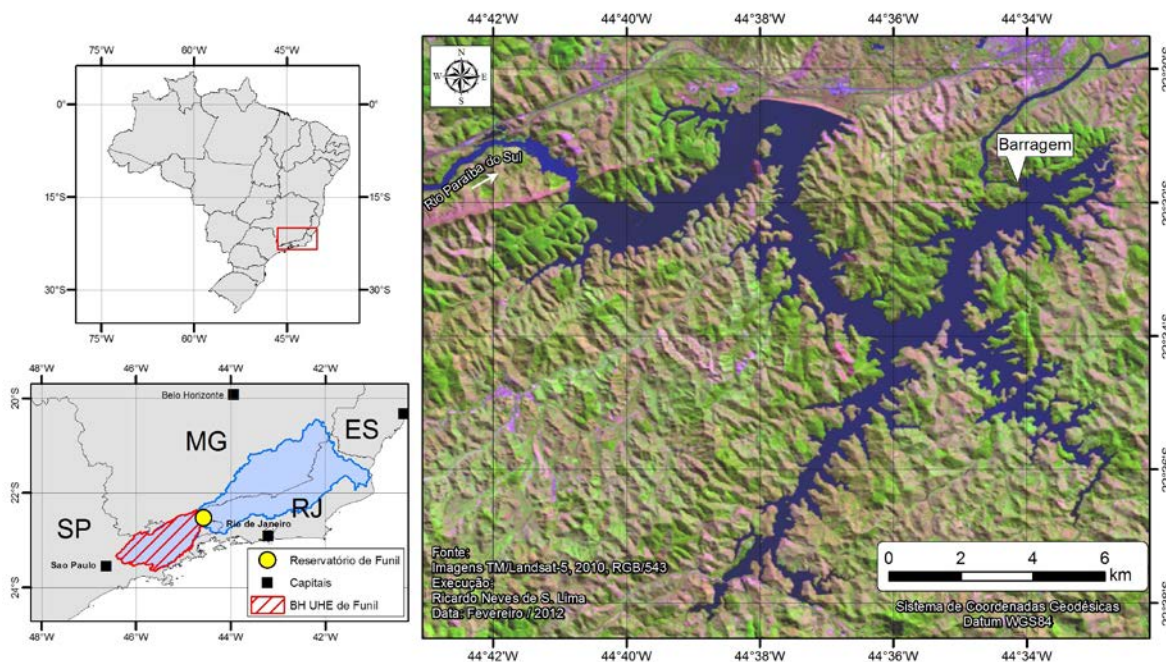


Figura 7: Localização geográfica do Reservatório do Funil. O Reservatório do Funil faz parte da bacia do rio Paraíba do Sul, que está localizado na região sudeste do Brasil e abrange o estado do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo. Mapa obtido ArcGIS, versão 10 (ESRI, 2010).

O Rio Paraíba do Sul (Fig.7) passa por uma área considerada a mais desenvolvida do país e está localizado entre três estados com grande atividade econômica (SP, RJ e MG). O Rio Paraíba do Sul e seus afluentes têm sido corpos receptores dos efluentes urbanos, industriais e agrícolas da bacia do rio Paraíba do Sul e, dessa forma, utilizados como meio de diluição. Atualmente, o rio encontra-se sob forte pressão antrópica devido à ausência de tratamento dos esgotos domésticos da maioria das cidades, um dos principais fatores de degradação dos recursos hídricos da região. Além dos efluentes industriais e esgotos domésticos, recebe também carga de sedimentos particulados originários de atividades humanas e de processos erosivos da devastação da cobertura vegetal do entorno da bacia (Da e Médio, 2012).

Trabalhos do início da década de 1980 já relatam que o reservatório do Funil vem sofrendo um intenso processo de eutrofização acarretando variáveis químicas e físicas que associadas a fatores bióticos afetam o ecossistema, alternando as comunidades nele presente. Assim, mudanças como a disponibilidade de nutrientes essenciais, temperatura, qualidade do substrato orgânico, transparência da água e penetração da radiação ultravioleta na coluna d'água devido a eutrofização, influenciam direta ou indiretamente a comunidade bacteriana de ambientes aquáticos (Margalef, 1983).

Para coleta das amostras, foram utilizados recipientes plásticos de 500 mL vedados com papel alumínio na boca e tampa e autoclavados a 1 atm, evitando contato com as mãos ou qualquer outro contato com o meio externo. As amostras de água foram coletadas na sub-superfície do reservatório, armazenadas imediatamente em caixas de isopor sob refrigeração a 5 °C e levadas ao laboratório para o estabelecimento de culturas de bactérias aquáticas.

4.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS

Apenas uma pequena porcentagem do número total de bactérias em uma amostra de água natural pode ser cultivada por meio de técnicas convencionais. A cultivabilidade de bactérias a partir de diferentes habitats é de 0,25% em água doce e até 2% em água do mar (Bernard *et al.*, 2000). As bactérias cultiváveis são definidas como a fração de todas as células capazes de crescimento laboratorial em meios artificiais (Bussmann, Philipp e Schink, 2001). Desta forma, para o estabelecimento de

culturas de bactérias aquáticas de água doce foram realizados diferentes procedimentos conforme abaixo.

4.2.1 Diluição Seriada das Amostras

Para o estabelecimento das culturas bacterianas em laboratório, amostras do Reservatório do Funil foram inicialmente submetidas a um processo de diluição seriada (Fig. 8). A diluição seriada consiste em diluir a amostra para diminuir a concentração de bactérias, permitindo crescimento amplo da diversidade de bactérias cultiváveis. Em capela de fluxo laminar (1300 SERIES A2, Thermo Scientific USA), foi transferido 1mL de amostra para um tubo de ensaio estéril contendo 9mL de solução salina (NaCl 0,9%). Assim foram realizadas 4 diluições seriadas na escala de 1:10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) (Fig.9).

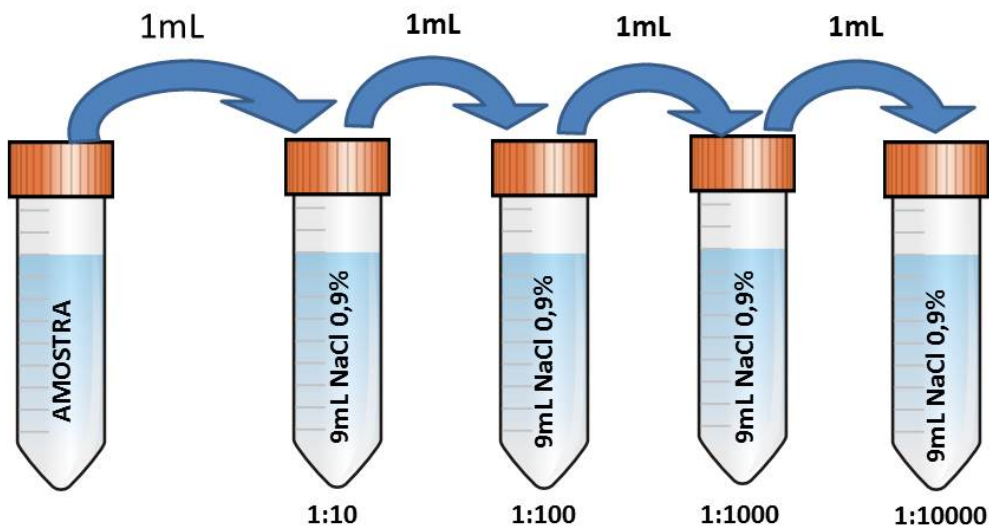


Figura 8: Representação esquemática do processo de diluição seriada (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) a partir de uma amostra não diluída. Alíquotas de 1mL são transferidas seriadamente de uma solução para outra, sendo homogeneizadas a cada transferência.

4.2.2 Meios de Cultura e Plaqueamento

A fim de possibilitar o crescimento de maior número possível de espécies bacterianas presentes na amostra, optou-se por utilizar meios de cultura não seletivos sólidos: TSA (Tryptic soy agar, Bacto®, BD, USA) e R2A (Himedia®); e meio não seletivo líquido: TSB (Tryptic soy broth, Bacto®, BD, USA). TSA é um meio de cultura bacteriano rico em nutrientes como triptona, peptona, carboidratos, proteínas e lipídios para o desenvolvimento dos microrganismos (BioCen, Campinas, SP, Brasil). R2A possui baixa concentração de nutrientes, sendo um meio alternativo usado para contagem de placas heterotróficas e para isolar subculturas de água potável. O meio R2A é recomendado pela APHA (American Public Health Association) para plaqueamento, espalhando em placa e técnica de membrana filtrante. TSB é, segundo o fabricante, um meio rico em nutrientes, de propósito geral usado para o cultivo de uma ampla variedade de microrganismos e testes de esterilidade de bolores e bactérias.

De acordo com o número de placas de Petri e com as instruções dos fabricantes, os meios de cultura TSA e R2A, respectivamente, foram pesados e dissolvidos em frascos erlenmeyer de 500 mL e esterilizados em autoclave, a 121 °C (1 atm), durante 20 minutos. Posteriormente, os meios foram arrefecidos até cerca de 50-55 °C. Em fluxo laminar (1300 series A2, Thermo Scientific), cerca de 20 mL foram evertidos em cada placas de Petri estéreis. Os meios preparados que não foram imediatamente utilizados, foram guardados sob refrigeração 4 °C, vedados com filme PVC.

4.2.3 Semeadura

Através da técnica de semeadura “spread-plate” ou por distensão, uma alíquota de 100µL de cada diluição obtida a partir da diluição seriada, sob de fluxo laminar, foi inoculada em uma placa de Petri contendo o meio, em triplicata (Fig.9). A alíquota inoculada na placa foi homogeneizada em movimentos circulares moderados com auxílio de uma alça de Drigalsky de vidro, previamente esterilizada em lamparina de álcool. As placas foram nomeadas e incubadas em posição invertida à temperatura ótima de 28°C por 72horas em uma estufa de cultura bacteriológica (SPLABOR Brasil)

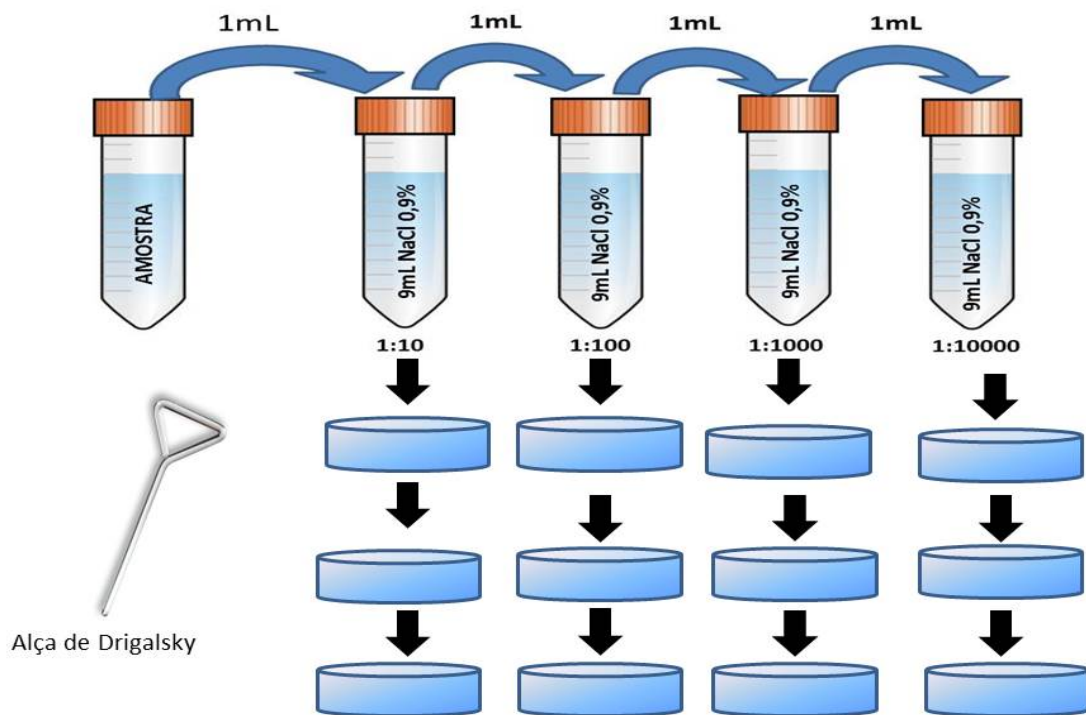


Figura 9. Esquema de inoculação de alíquotas de diferentes diluições seriadas a partir da amostra em meio de cultura sólido.

4.2.4 Caracterização Morfológica Macroscópica das Colônias Bacterianas

Ao término do período de incubação, morfotipos foram determinados de acordo com as características da colônia, como coloração, formato da borda, elevação, detalhe óptico, tamanho e textura da colônia segundo “Manual of microbiological methods” (Conn, 1957), como na Fig. 10.




Tamanho	Grande ($\geq 5\text{mm}$) , Média (2 a 5mm) ou Pequena ($\leq 2\text{mm}$)
Detalhe Óptico	Translúcida, Transparente, Opaca ou Brilhante
Textura	Lisa, Rugosa, Filamentosa, Rugosa e Mucóide
Bordas	 Inteira Ondulada Lobulada Filamentosa Espiral
Elevação	 Plana Elevada Convexa Crateriforme Papilada
Formas	 Puntiforme Circular Filamentosa Irregular Rizoide Fusiforme

Figura 10: Critérios de caracterização macroscópica de colônias bacterianas.
Extraída de (Apha., 1976).

4.2.5 Isolamento e Coleção das Colônias Morfotipos

4.2.5.1 Isolamento

Após a caracterização macroscópica das colônias morfotipos, procedeu-se ao isolamento destas para posterior purificação. O isolamento foi realizado em capela de fluxo laminar onde, com o auxílio de um alça de platina previamente esterilizada em lamparina de álcool, uma porção da colônia de um morfotipo selecionado foi transferida para uma placa de Petri contendo o mesmo meio de cultivo através da técnica de semeadura por estrias múltiplas. Esta placa, identificada de acordo com o morfotipo

inoculado, foi incubada nas mesmas condições utilizadas no processo de semeadura. Cada morfotipo visualizado como organismo distinto recebeu uma identificação.

Ao término do período de incubação e verificado o crescimento e a ausência de morfotipos diferentes daquele inoculado, realizou-se o processo de purificação do morfotipo. Para a purificação, uma porção de uma colônia bem isolada foi transferida da placa de isolamento e estriada em uma placa de purificação contendo TSA enriquecida com 3% NaCl (TSA-SAL) e incubada pelo mesmo tempo e temperatura utilizados no processo anterior (Fig.11). O processo de purificação foi repetido três vezes ou até que se obtivesse uma colônia pura, ou seja, sem a presença de outros morfotipos (contaminação).

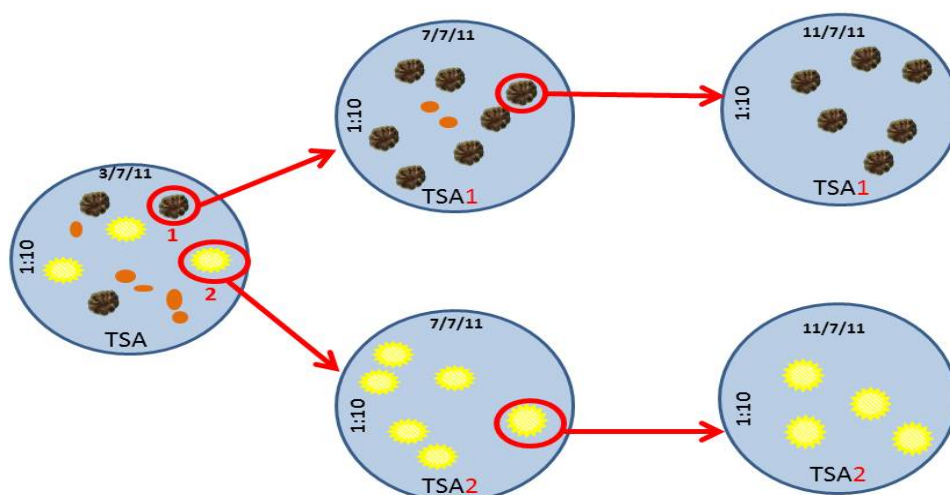


Figura 11: Esquema do isolamento de dois morfotipos (1 e 2) em meio TSA.

4.2.5.2 Conservação e coleção

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.

Em um tubo de ensaio estéril, 8 mL de meio TSA-SAL, previamente autoclavado a 121 °C (1 atm) durante 20 minutos, foi evertido e colocado em uma inclinação de aproximadamente 45° para sua solidificação. Sob capela de fluxo laminar, com auxílio da alça de platina previamente esterelizada em lamparina de álcool, uma

pequena porção da colônia purificada foi pinçada e, por técnica de estriação simples, adicionada ao meio inclinado. O tubo de ensaio foi mantido em uma estufa bacteriológica a 28°C até que fosse verificado o crescimento de colônias. Em seguida foi adicionado 200 µl de glicerol 30% e mantido a temperatura de 5°C. Com a finalidade de elaborar uma coleção desses isolados por longo período, foi preparado um meio de cultura líquido não seletivo, TSB em frasco Erlenmeyer de 500mL, autoclavado a 121 °C (1 atm) por 15 minutos, seguindo as instruções do fabricante. O morfotipo purificado, sob de fluxo laminar, foi pinçado com auxílio da alça de platina previamente esterelizada em lamparina de álcool, e inoculado no meio TSB preparado. 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 esterelizado. Setessentos µL desta diluição foram transferidos com auxílio de pipeta graduada estéril para tubo cônico estéril de 1mL, e neste, adicionados 300 µL de glicerol. Os tubos foram armazenados à temperatura de -80°C em ultrafreezer (Thermo Electron Corporation, USA).

4.3 EXPERIMENTOS COM RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

4.3.1 Lâmpadas

Foram utilizadas lâmpadas artificiais com radiação ultravioleta (UV), TL 40/05 e TL 20/01 (Philips), com pico de emissão em 365 e 312 nm, representando as faixas de comprimento de onda ultravioleta A (UV-A) e ultravioleta B (UV-B) respectivamente, de acordo com protocolo estabelecido previamente no Laboratório de Ecologia Aquática da UFJF por Noyma, 2003 (Noyma, Melo e Roland, 2009). De acordo com este protocolo, a radiação ultravioleta solar, medida com auxílio de um radiômetro modelo IL 1400A (International Light), a cada uma hora, em um período de 10 horas, em um dia sem cobertura de nuvens, corresponde à radiação ultravioleta solar emitida pelas lâmpadas. Estas lâmpadas foram instaladas em um compartimento de madeira com dimensões de 150 x 70x 40 cm, com tampa (Fig. 12).

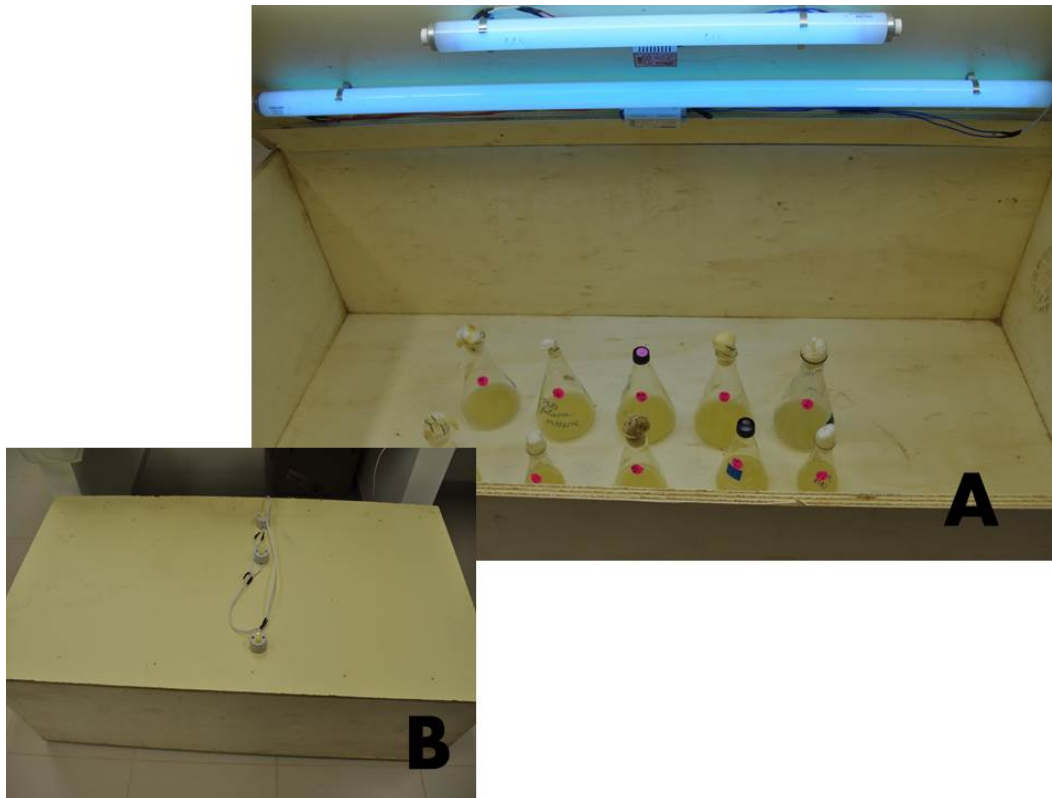


Figura 12: Fotos representativas dos experimentos com radiação ultravioleta mostrando a disposição das lâmpadas. (A) Compartimento de madeira aberto, mostrando a disposição das lâmpadas sobre os frascos com a cultura bacteriana e (B) compartimento fechado e seu sistema de energia elétrica.

O compartimento de madeira, em testes preliminares, se comportou como isolante térmico, independente da temperatura ambiente, mantendo a temperatura a 30° C com as lâmpadas funcionando.

4.3.2 Transferência de Morfotipos Isolados para Cultura Líquida e Determinação da Fase Estacionária da Comunidade Bacteriana

Para o desenvolvimento dos experimentos, os morfotipos das colônias isolados dos meios TSA e R2A de todas as diluições realizadas, foram pinçados, e em de fluxo laminar, com auxílio da alça de platina previamente esterelizada por lamparina de álcool, inoculados no meio de cultura líquido não seletivo TSB anteriormente autoclavado a 121 °C (1 atm) durante 20 minutos. Todos os morfotipos isolados foram

coletados para obtenção de maior representatividade da comunidade bacteriana do ambiente.

Após a inoculação dos morfotipos em um frasco Erlenmeyer contendo 500mL de TSB, o meio foi incubado por 12hs, em estufa bacteriológica, a uma temperatura ótima de crescimento de 28°C. 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 (Trabulsi e Alterthum, 2004). Na fase estacionária a taxa de crescimento e morte bacteriano se equilibram, tornando constante o número de células. Considerando que o foco do presente estudo envolve fatores que alteram a dinâmica da comunidade no meio de cultura, como a radiação ultravioleta, utilizamos a fase estacionária para a realização dos experimentos.

A determinação da fase estacionária foi realizada através da leitura da densidade óptica no espectrofotômetro (DU®640 Spectrophotometer, Beckman Coulter). Posteriormente, a absorvância foi correlacionada com a densidade óptica bacteriana determinada conforme descrito na sessão **5.2.1**. Em capela de fluxo laminar, foram transferidas alíquotas de 2mL da cultura líquida para um tubo de ensaio estéril com tampa e levadas ao espectrofotômetro. Foram feitas leituras na faixa de comprimento de onda de 600 nm em intervalos de uma hora, até que se obtivesse estabilidade na absorvância. Assim, o experimento com radiação ultravioleta foi iniciado.

4.3.3 Desenho Experimental

Foram estabelecidos dois grupos: o controle, não submetido à radiação ultravioleta e o UV, submetido à radiação ultravioleta (Fig. 13). Previamente ao início do experimento, tanto as réplicas do controle, quanto as dos tratamentos foram mantidas sob as mesmas condições do cultivo. Réplicas da alíquota da diluição da cultura estoque foram submetidas à tratamentos com radiação ultravioleta (UV-A+ UV-B). No tratamento controle, as cepas foram mantidas sob as mesmas condições, sendo conservadas no próprio local do cultivo. No tratamento com ultravioleta (A+B), as réplicas foram mantidas sob efeito de ambas as lâmpadas ligadas. Os tratamentos tiveram duração total de três horas sob a influência da luz, em frasco de erlenmeyer com o volume de 100 mL. A utilização de frascos de borosilicato (erlenmeyer) deve-se à capacidade deste material de barrar radiação UV, principalmente UV-B, uma vez que a

intensidade da emissão da lâmpada deste comprimento de onda foi superior à intensidade necessária para o experimento.

Em capelar de fluxo laminar e com auxílio de pipetas estéreis, as amostras foram retiradas a cada hora para a análise de curva de crescimento, por densidade óptica e contagem de bactérias por microscopia de fluorescência, e viabilidade celular. Para alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foram retiradas ao final do período de três horas. Antes de cada amostragem, os fracos foram devidamente homogeneizados manualmente. A temperatura foi controlada, e mantida a 30°C durante todo o experimento.

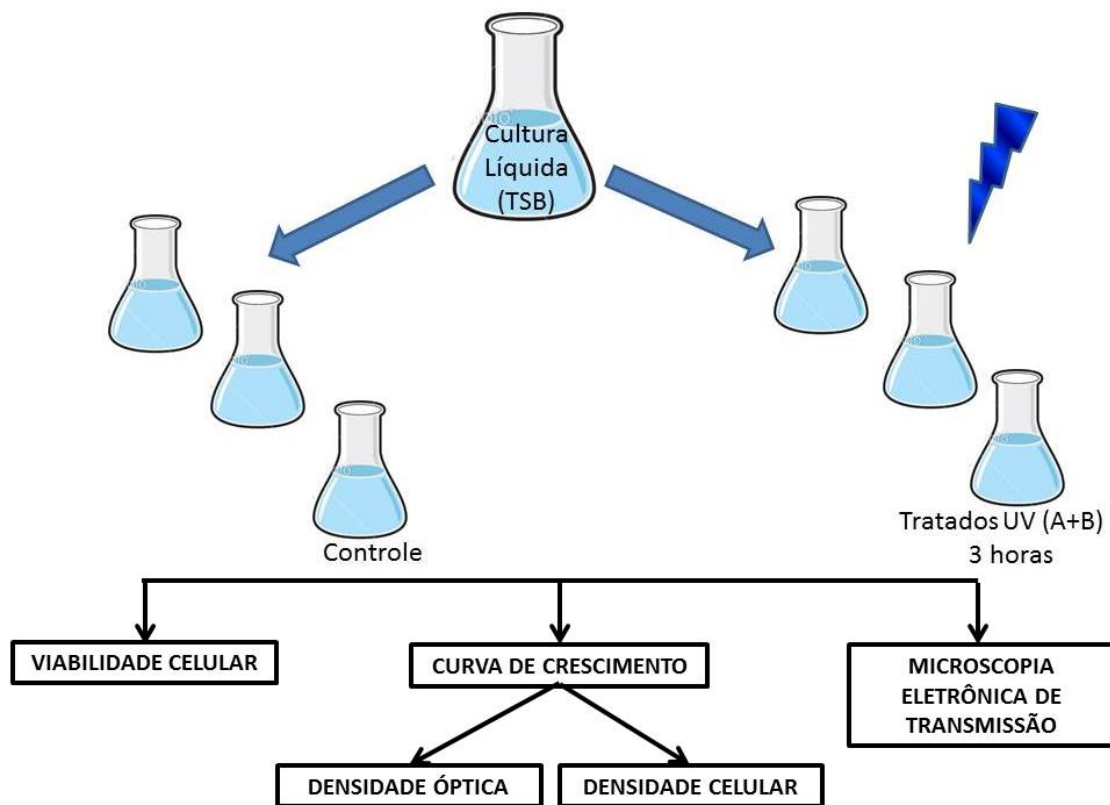


Figura 13: Desenho experimental mostrando os parâmetros analisados após tratamento e no grupo controle.

4.4 VIABILIDADE CELULAR

Para análise da viabilidade celular, baseado na integridade de membrana, foi utilizado o kit LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes). Este kit é constituído de dois marcadores: SYTO 9 que cora todas as células, íntegras ou com danos na membrana e iodeto de propídeo, o qual penetra somente em bactérias com danos em sua membrana, causando uma redução na fluorescência do SYTO 9. Com a mistura destes marcadores, bactérias com membranas intactas emitem fluorescência verde e bactérias que apresentam dano de membrana, emitem fluorescência vermelha. Volumes iguais dos marcadores SYTO 9 e iodeto de propídeo foram misturados. A cada 3µL desta solução, adicionou-se 1 mL da cultura líquida, as quais foram incubadas por 20 minutos no escuro. Em seguida, as lâminas foram obtidas por citocentrifugação (Shandon cytospin 4, Thermo Electron) a 452x g por 10 min em alta aceleração (Silva *et al.*, 2013) (Fig. 14).

As lâminas resultantes foram analisadas em microscópio de fluorescência BX-60 (Olympus), equipado com filtro U-MWB com a emissão no comprimento da luz azul, o qual possibilita a visualização simultânea dos marcadores. Foram analisadas uma amostra para cada grupo nos diferentes tempos: 0h, 1h, 2h e 3h. A contagem foi realizada em 5 campos aleatórios.

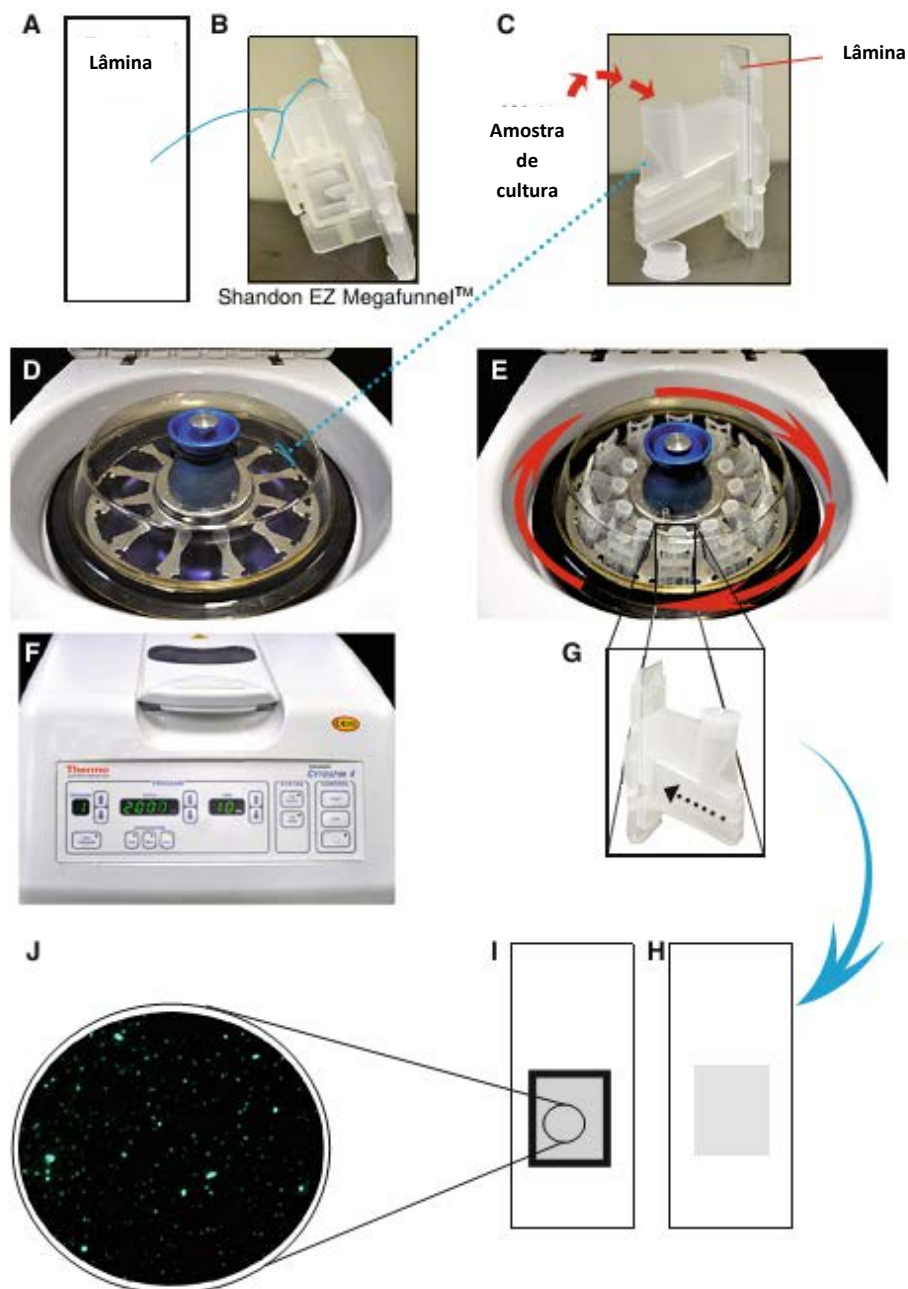


Figura 14: Método de citocentrifugação para amostra de cultura bacteriana. Em (A) e (B), uma lâmina regular é acoplada no Shandon EZ Megafunnel™. (C): Cultura líquida (1mL) corada é adicionada câmara de amostra do Megafunnel. (D): O Megafunnel é então encaixado no local indicado dentro do citocentrífuga. Em (E) e (F) depois de fechar a tampa externa, parâmetros de rotação são definidos no painel de controle (452x g por 10 min em alta aceleração). Em (G), é visto o Megafunnel na posição vertical (posição de balanço). A força centrífuga (seta) permite que a célula seja empurrada para a lâmina. Isto efetivamente contorna as dificuldades normalmente associada a deposições obtidas por exame direto ou filtração. (H) A lâmina é desacoplada da Megafunnel e uma monocamada de células pode ser observada em uma zona definida na lâmina. Em (I) e (J), depois de esperar alguns minutos (3-5) para secar, a

lâmina é montada e está pronta para ser analisada por microscopia de fluorescência. Extraído de Silva *et al.* (2013).

4.5 CURVA DE CRESCIMENTO

Para estabelecer a curva de crescimento, dois parâmetros foram analisados: densidade óptica por espectrofotometria e números de células bacteriana/mL por microscopia de fluorescência. Para a análise da curva de crescimento bacteriano, a quantificação celular foi estimada através da avaliação da densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm, e posterior contagem através de microscopia de fluorescência, com o marcador 4',6 – diamidino-2- fenilindol-dihidrocloro (DAPI).

4.5.1 Densidade Óptica por Espectrofotometria

Alíquotas de 2mL, em capela de fluxo laminar, com auxílio de pipetas graduadas estéreis foram transferidas para um tubo de ensaio estéril com tampa, e utilizadas para medição da massa celular em espectrofotômetro. Essa etapa foi realizada repetidamente a cada uma hora ao longo do experimento. Um tubo de ensaio contendo o meio TSB, previamente autoclavado, foi utilizado durante o experimento, como controle, para zerar o espectrofotômetro nos momentos de avaliação da densidade óptica. Para a montagem da curva do número de células por mL de meio de cultura, foram utilizados os valores de menor diluição que possibilitavam sua leitura.

4.5.2 Densidade Bacteriana

A densidade bacteriana foi quantificada em lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas com utilizando o DAPI. O DAPI é um marcador que se liga a fita dupla de DNA emitindo uma fluorescência azul (Joux e Lebaron, 2000).

As amostras foram fixadas em formaldeído 2%, coradas DAPI na concentração final 5µg/mL e preparadas em citocentrífuga (Shandon cytospin 4, Thermo Electron) à 452 x g, durante 10 minutos em alta aceleração (Silva *et al.*, 2013) (Fig. 14) As lâminas foram montadas com óleo de imersão 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: $(n \times a) / (V \times a)$, onde n = número de células contadas, a = área da grade contada, e V = (volume fixado de amostra x volume contado) / (volume da amostra + (volume do fixador)).

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para a análise ultraestrutural de bactérias por MET, foram processadas amostras coletadas de bactérias em cultura dois grupos: I controle e UV, após 3h do início do experimento. As amostras foram 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 *et 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, estes foram incluídos em ágar 2%, o que possibilita que as etapas subsequentes sejam realizadas sem o contato direto com os organismos. Esta préinclusão 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.

4.7 OBTENÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS

As amostras processadas para microscopia de fluorescência foram fotografadas com câmera digital Evolution VF (Media Cybernetics) acoplada ao microscópio de fluorescência BX-60 (Olympus), com a utilização do programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics).

Para as análises ultraestruturais, foram estudadas um total de 168 micrografias, sendo 84 micrografias para cada grupo, em aumentos de 25000x a 150000x. Para as avaliações morfométricas das bactérias nas micrografias obtidas por MET foi utilizado o programa Image J (National Institute of Mental Health, USA). Os seguintes parâmetros foram estudados:

1. Características gerais da ultraestrutura bacteriana: Foram analisadas a ocorrência das principais estruturas bacterianas, como nucleíode, vesículas
2. Envoltório celular: foram analisadas características dos envoltórios celulares em ambos os grupos estudados, como espessura e tipo (gram-positivo ou gram-negativo).
3. Tamanho médio da cápsula
4. Integridade ultraestrutural bacteriana: Esta foi analisada e classificada em (A) íntegras, quando apresentaram membrana plasmática, parede celular e estruturas internas sem dano estrutural; (B) danificadas, para bactérias que apresentaram danos em alguma estrutura e/ou membrana e parede célula; e (C) vazias, células que apresentam seu conteúdo esvaziado ou em esvaziamento e/ou com fragmentos celulares amorfas que não apresentaram similaridade com estruturas citoplasmáticas.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação da viabilidade celular e fragmentação de DNA foi utilizado o ANOVA oneway, para diferença significativa entre os três sistemas estudados e o teste t para diferenças significativas entre as médias em cada sistema.

As análises estáticas e gráficos foram feitos com a utilização do programa Prisma v. 5.01 (GraphPad Software Inc).

4.9 DESTINO DE MEIOS DE CULTURA E MATERIAIS UTILIZADOS NOS ENSAIOS

Após cada avaliação, os meios e frascos utilizados foram devidamente autoclavados para sua esterilização, antes de seu descarte em lixo biológico, de modo a evitar quaisquer contaminações de outras vias.

5 RESULTADOS

5.1 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS

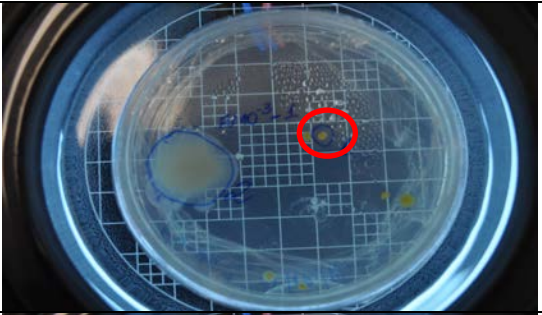
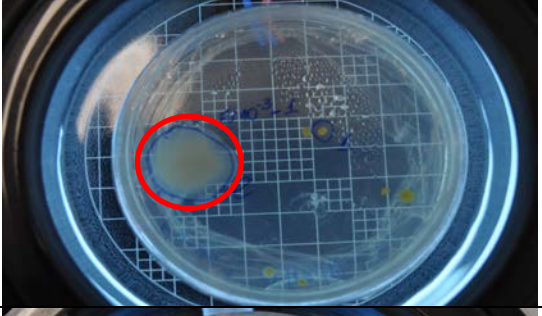

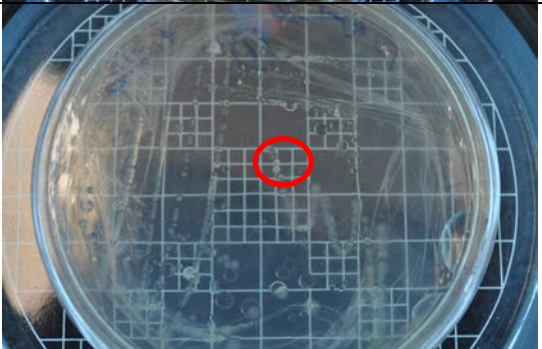

Culturas de bactérias aquáticas foram estabelecidas em dois meios de cultura sólidos não seletivos: R2A e TSA. As bactérias foram semeadas em diferentes diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), e em ambos os meios foram observados o crescimento de colônias bacterianas. As colônias foram isoladas de acordo com os aspectos morfológicos das colônias encontradas descritos a seguir.

5.1.1 Aspectos Morfológicos das Colônias Bacterianas

As colônias bacterianas apresentaram diferentes aspectos morfológicos, os quais foram considerados como morfotipos. Os morfotipos foram descritos de acordo com suas características macroscópicas (Conn, 1957) (Fig.15). Foram encontrados 5 morfotipos nas diferentes diluições, nos meios de cultura R2A e TSA e uma maior diversidade de morfotipos em meio R2A, conforme mostrado na tabela 1.

No meio R2A, o crescimento de morfotipos foi observado nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , enquanto no meio TSA, detectou-se crescimento na diluição 10^{-1} .

Após isolamento, os morfotipos foram conservados à -80°C em ultrafreezer no Laboratório de Biologia Celular/UFJF.

MORFOTIPO	MEIO	CARACTERIZAÇÃO	
MF1	R2A	Pequena Forma: Circular Elevação: Convexa Borda: Lisa Estrutura: Lisa Brilho: Opaca Cor: Amarelo	
MF2	R2A	Grande Forma: Irregular Elevação: Elevada Borda: Ondulada Estrutura: Lisa Brilho: Opaca Cor: Bege claro	
MF3	TSA	Pequena Forma: Circular Elevação: Convexa Borda: Lisa Estrutura: Granulosa Brilho: Opaca Cor: Amarelo claro	
MF4	R2A, TSA	Pequena (2mm) Forma: Circular Elevação: Elevada Borda: Lisa Estrutura: Lisa Brilho: Translúcida Cor: Branca	
MF5	TSA	Grande Forma: Rizóide Elevação: Elevada Borda: Lobada Estrutura: Lisa Brilho: Opaca Cor: Bege Claro	

MF6	R2A	Grande Forma: Rizóide Elevação: Elevada Borda: Filamentosa Estrutura: Filamentosa Brilho: Translúcida Cor: Branca	
------------	-----	---	--

Figura 15: Caracterização morfológica das colônias de bactérias aquáticas em meio R2A e TSA. Nas imagens os morfotipos foram evidenciados pelo círculo vermelho.

Tabela 1: Morfotipos encontrados em meio R2A e TSA

	R2A	TSA
Morfotipos	MF1, MF2, MF3, MF4 e MF6	MF4 e MF5
Total de morfotipos	5	2

5.2 CURVAS DE CRESCIMENTO

Após estabelecimento das culturas bacterianas em meio sólido, os morfotipos foram transferidos para meio de cultura líquido não seletivo (TSB) e incubados por 12 horas, conforme descrito na seção 4.3.2, para a realização dos experimentos de exposição das bactérias à radiação UV. Para isso, foi necessária inicialmente a análise do comportamento da curva de crescimento bacteriano nas culturas em meio TSB. As bactérias foram submetidas à radiação ultravioleta quando a curva de crescimento se mostrou estável (fase estacionária).

5.2.1 Curva de Crescimento Padrão por Densidade Óptica

Para estabelecimento da curva de crescimento padrão, foi realizada a análise de absorvância obtida pela densidade óptica do meio de cultura líquido inoculado, a cada hora, durante 20 horas. A curva de absorvância mostrou-se estável entre 3 e 10 horas (Fig. 16A).

5.2.2 Curva de Crescimento Padrão por Densidade Bacteriana

A curva de crescimento padrão também foi obtida através da contagem da densidade bacteriana na cultura líquida. As lâminas foram preparadas por citocentrifugação, coradas com DAPI e analisadas por microscopia de fluorescência (Fig. 16B e C).

A partir da contagem bacteriana durante 10 horas, foi estabelecida a curva de crescimento padrão. Entre a segunda e a nona contagem (2h-9h), foi verificada uma fase de estabilidade no crescimento bacteriano (Fig. 16B), que entrou em declínio a partir da décima hora.

Comparando a curva de crescimento padrão por densidade óptica e por densidade bacteriana, concluiu-se que a fase estacionária se dá a partir da terceira hora.

5.3 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Os dois grupos experimentais: (1) UV, submetido à radiação ultravioleta; e (2) Controle, mantidos sob as mesmas condições de temperatura, e analisados durante 3 horas, mostraram o seguinte comportamento, com relação às curvas de crescimento:

5.3.1 Análise da Curva de Crescimento por Densidade Óptica

A curva de crescimento por densidade óptica do grupo UV apresentou uma queda significativa na densidade óptica durante o experimento ($p < 0,05$) (Fig.16E). Já no grupo controle, a curva se manteve estável durante o experimento ($p > 0,05$), acompanhando o mesmo comportamento da curva de crescimento padrão, como pode ser observado na Fig.16E.

5.3.2 Análise da Curva de Crescimento Bacteriano por Densidade Bacteriana

No grupo UV, foi verificada uma diminuição significativa na densidade bacteriana da primeira para terceira hora de exposição à radiação ultravioleta ($p < 0,05$), que pode ser relacionada com a queda gradual na curva de crescimento (Fig. 16D). Já no grupo controle, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na densidade bacteriana, em acordo com a estabilidade apresentada pela curva de crescimento (Fig.16D).

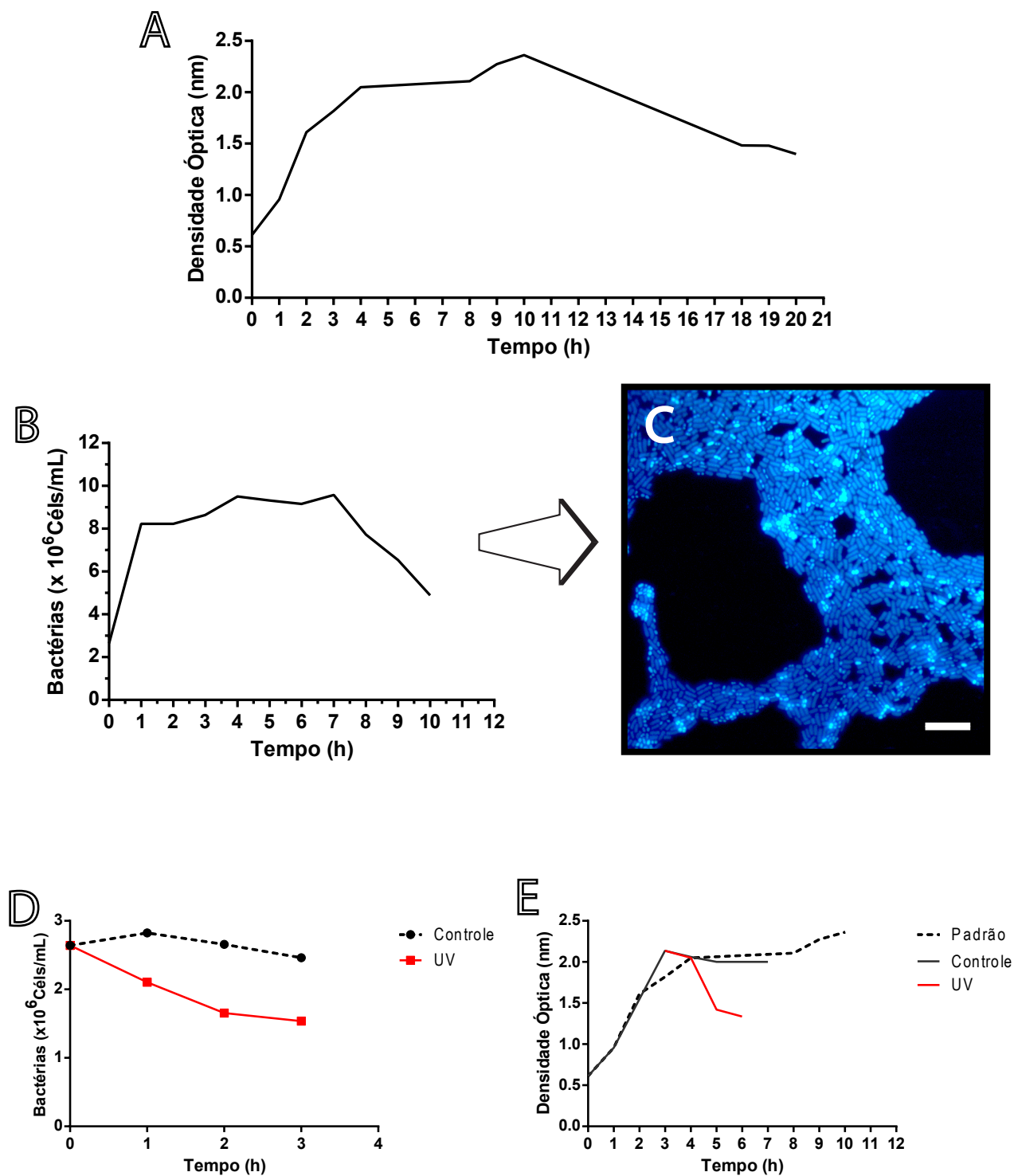


Figura 16: Curvas de crescimento bacteriano por densidade óptica e densidade de bactérias. Em (A), curva de crescimento padrão obtida por espectrofotometria através de análise de densidade óptica durante 20 horas. Em (B), curva de crescimento padrão obtida por contagem de células bacterianas coradas com DAPI e analisadas por microscopia de fluorescência (C), durante 10 horas. Observe em (A) e (B) que há uma estabilidade das curvas de crescimento na terceira hora, indicando o início da fase estacionária. Já (D) e (E) mostram curvas de crescimento de bactérias após exposição à radiação ultravioleta comparadas com controle nas três primeiras horas, enquanto (E) mostra esta comparação ao longo de 10 horas. Bactérias aquáticas foram cultivadas em meio TSB. Barra=10 μ m.

5.4 VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da integridade da membrana celular foi usada como indicativo da viabilidade de bactérias aquáticas nos grupos controle e UV. A técnica de citocentrifugação, aliada à utilização do kit LIVE/DEAD *BacLight* (Silva *et al.*, 2013) permitiu boa visualização, por microscopia de fluorescência, de bactérias viáveis e inviáveis na cultura estudada. De acordo com os marcadores utilizados (SYTO 9 e iodeto de propídeo), células com membranas alteradas apresentaram fluorescência vermelha, enquanto células com membranas intactas apresentaram fluorescência verde (Fig. 17A e 18).

Bactérias viáveis e inviáveis foram observadas tanto no grupo controle como no grupo UV. No entanto, as análises qualitativas e quantitativas em microscopia de fluorescência mostraram variação na quantidade de bactérias viáveis/inviáveis quando os dois grupos foram comparados (Fig. 17 e 18). Considerando as 3 horas de exposição à radiação ultravioleta em conjunto, o grupo UV apresentou maior porcentagem média de células inviáveis (38,28%) comparado com o grupo controle (18,23%) ($p < 0,05$) (Fig. 17B). No grupo controle, não houve diferença significativa na porcentagem média de células inviáveis (Fig. 17C; $F=0,16$, $p=0,92$).

No grupo UV, comparando a porcentagem média de bactérias inviáveis do início da exposição à radiação ultravioleta (tempo 0h) com cada um dos tempos subsequentes (0h, 1h, 2h, 3h) foi verificado um aumento significativo ($F=4,38$, $p < 0,05$) de células inviáveis. Além disso, houve diferença significativa quando a porcentagem média de bactérias inviáveis observadas após a primeira hora de exposição foi comparada com a documentada após a terceira hora (1h, 3h, $p=0,037$). Porém não houve diferença significativa na porcentagem média de bactérias inviáveis entre a segunda e terceira hora de exposição, ($F=0,83$, $p < 0,05$).

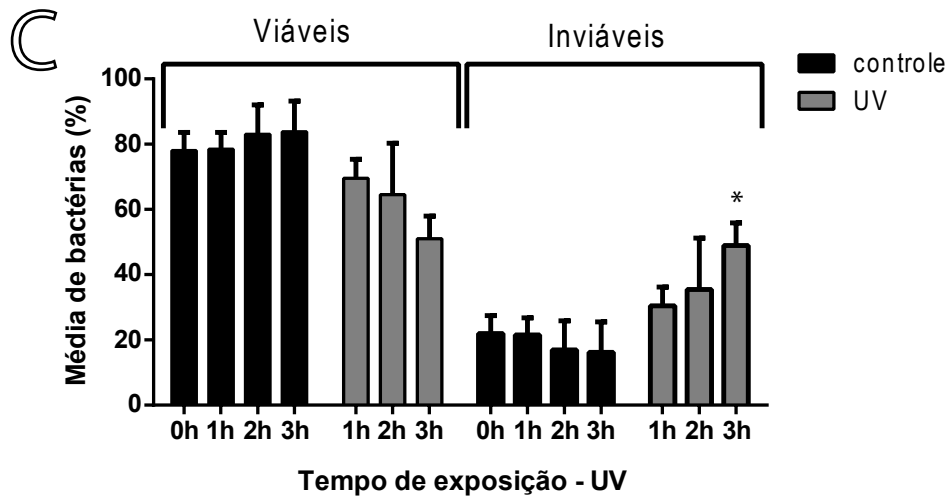
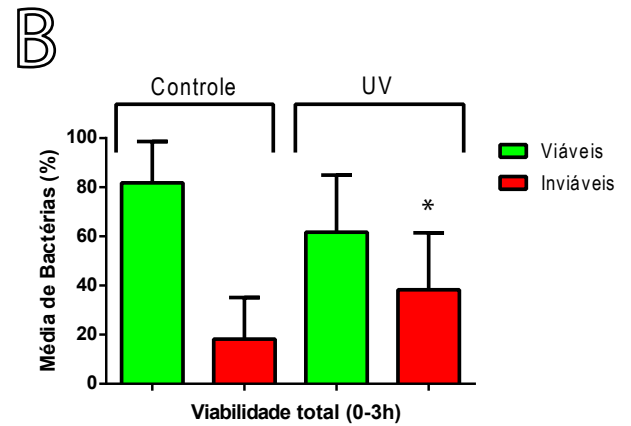
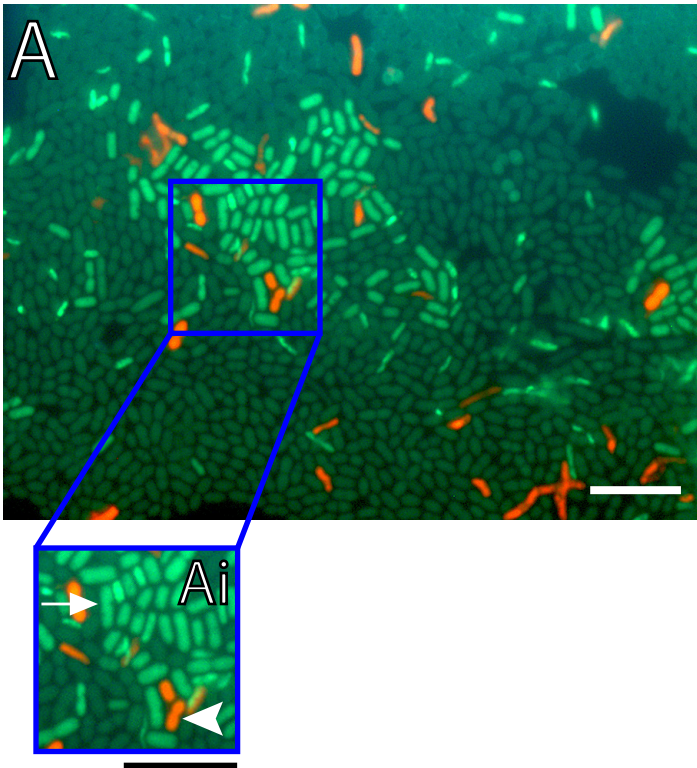
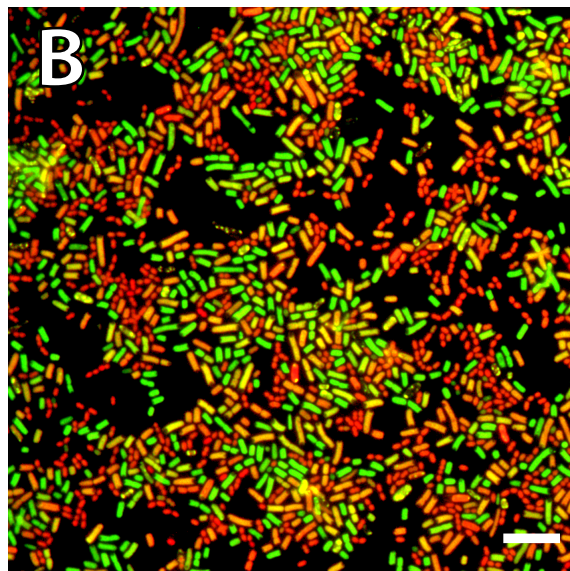
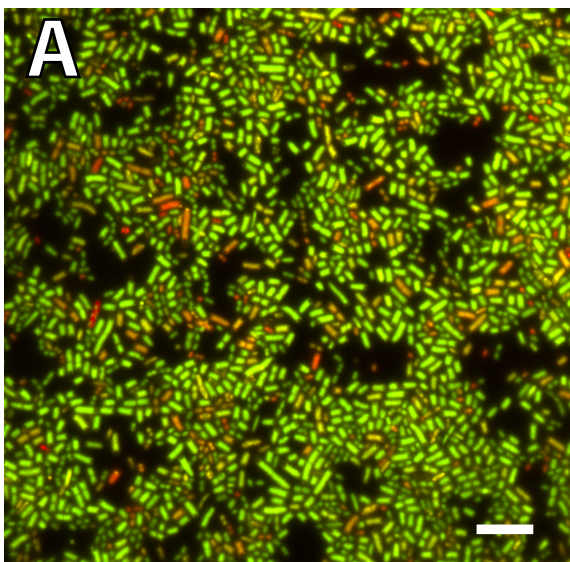


Figura 17: Viabilidade celular em bactérias aquáticas cultiváveis. Amostras submetidas à radiação ultravioleta e controle (n=15), foram citocentrifugadas, coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight. Em (A) observa-se bactérias aquáticas por microscopia de fluorescência no início do experimento (0h). No detalhe (Ai), note a presença de bactérias em verde, viáveis (seta) e em vermelho, inviáveis (cabeça de seta). Em (B), é mostrado a porcentagem média de bactérias por viabilidade nas três horas em conjunto. Já em (C) a viabilidade bacteriana é visualizada por hora, em cada grupo: Controle e UV. Em (B) e (C) o asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$). Barra, 10 μ m.

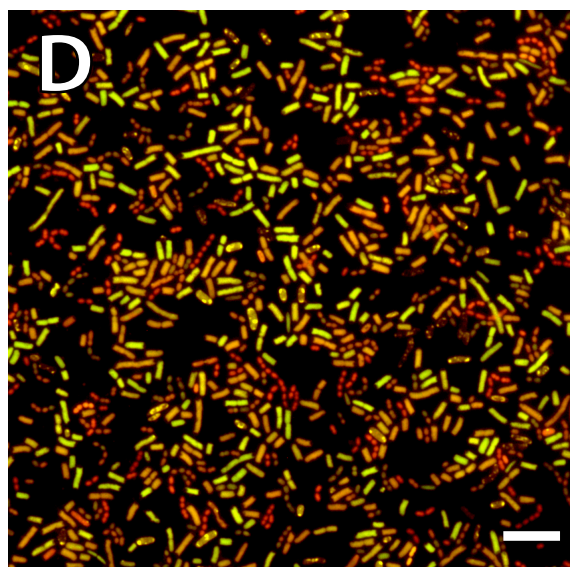
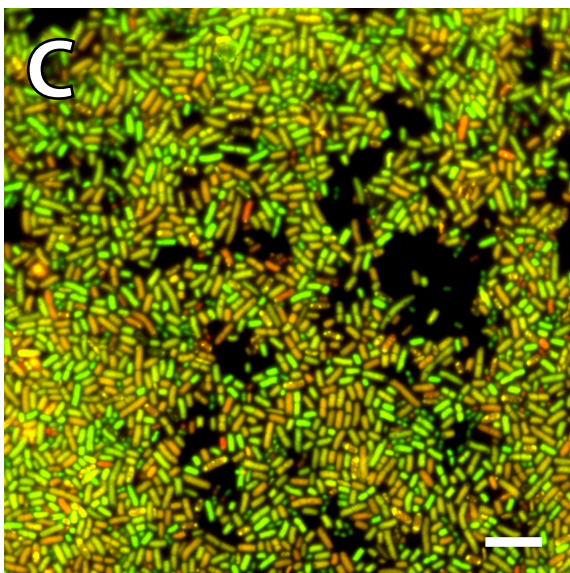
Controle

UV

1h



2h



3h

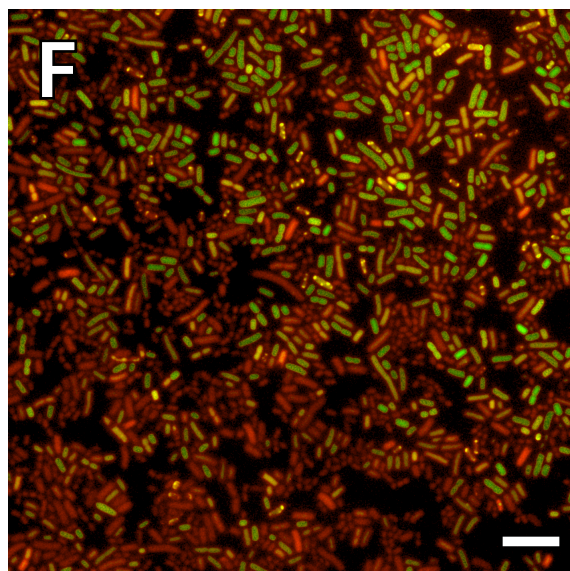
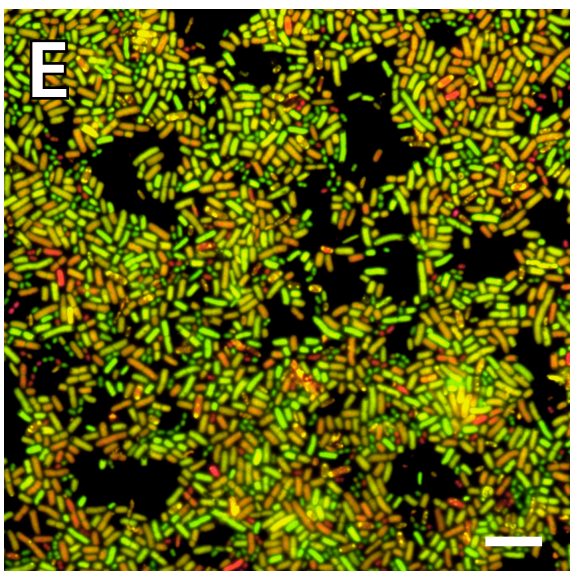


Figura 18: Viabilidade celular de bactérias aquáticas ao longo de três horas de exposição à radiação ultravioleta e controles. Bactérias aquáticas cultiváveis foram coradas com iodeto de propídeo e Syto9 (BacLight) e visualizadas por microscopia de fluorescência. As bactérias viáveis encontram-se coradas em verde enquanto as bactérias inviáveis em vermelho. Note a variação da quantidade de bactérias viáveis/inviáveis quando os grupos controles (A, C e E) e expostos à radiação UV (B, D e F) são comparados. Barra = 10µm.

5.5 ULTRAESTRUTURA

5.5.1 Aspectos Gerais

Análises ultraestruturais à MET mostraram bactérias com diferentes tamanhos e estruturas típicas como nucleóide, membrana plasmática com aspecto trilaminar, parede celular, mesossomos e grânulos. Além disso, observou-se diversidade ultraestrutural entre as bactérias, associada com a presença de diferentes estruturas bacterianas intracelulares e extracelulares, descritas abaixo.

Análises morfométricas mostraram que a área celular das bactérias variou de $0,93 \mu\text{m}^2$ à $1.290 \mu\text{m}^2$. Porém foi verificado que as bactérias expostas à radiação ultravioleta (grupo UV) apresentaram área celular de $0,4548 \pm 0,03102 \mu\text{m}^2$, significativamente maior que a do grupo controle, $0,3985 \pm 0,01987$ ($p < 0,05$).

A MET revelou bactérias com envoltórios celulares que apresentaram diferentes espessuras e aspecto ultraestrutural. Foram observados envoltórios bacterianos tipicamente gram-positivos (Fig. 19A e B), caracterizados pela presença de membrana plasmática e parede celular, e gram-negativos (Fig. 19C), caracterizados pela presença de membrana plasmática, espaço periplasmático e membrana externa. Em ambos os grupos, foi observada maior ocorrência de bactérias com parede celular gram-positiva (Tabela 2) do que gram-negativa. Entretanto, a ocorrência de gram-positivas foi maior no grupo exposto à radiação UV (82,14%). Vale ressaltar que na maioria das bactérias gram-positivas no grupo UV (84,05%), foi possível observar a presença de camada S compondo o envoltório celular (Fig. 19B e Bi). Porém, o envoltório celular foi significativamente mais espesso no grupo controle que no grupo UV ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Tipos de envoltórios celular observados em bactérias aquáticas de culturas após exposição ou não à radiação ultravioleta.

Tipo de envoltório bacteriano	Grupo Controle (%) <i>n=84</i>	Grupo UV (%) <i>n=84</i>
Gram-positivo	69,05	82,14
Gram-negativo	30,95	17,86

Análises ultraestruturais mostraram ocorrência de cápsulas formadas por matriz extracelular de exopolímeros em 78,57% das bactérias ($n=168$), com espessura variando entre $0,17\mu\text{m}$ - $0,120\mu\text{m}$. A ocorrência de estrutura capsular foi maior no grupo UV (85,71%) que no grupo controle (73,8%). Porém a média da espessura da cápsula foi significativamente menor no grupo UV ($p<0,05$).

As análises ultraestruturais permitiram observar nas bactérias, a presença de septos celulares dividindo a célula bacteriana (Fig. 20). Geralmente a presença de septos indica que a célula está em processo de divisão celular ou esporulação (Rothfield, Taghbalout e Shih, 2005). Observou-se a formação do septo de divisão na região mediana da célula, dando origem a duas células iguais, sinalizando crescimento vegetativo da célula bacteriana (Trabulsi e Alterthum, 2004) (Fig. 20A, Ai e C). A formação assimétrica do septo (Fig. 20B e Bi), assim como a presença de esporo (Fig. Bii), também foram documentadas, indicando ocorrência de esporulação (Rothfield, Taghbalout e Shih, 2005). Em geral, houve maior ocorrência de bactérias apresentando septos (50%) no grupo UV do que no grupo controle (14,28%).

Um aspecto marcante da análise por MET foi a presença de vesículas brotando na membrana externa das bactérias (Fig. 21 A, Ai e Aii). Estas vesículas projetavam-se para o meio extracelular onde liberavam seus produtos (Fig. 21B). Também foram observados grupos de bactérias descarregando conteúdos celulares em uma região extracelular específica (Fig. 21 B e C).

5.5.2 Integridade Ultraestrutural

Para investigar a ocorrência de alterações ultraestruturais induzidas pela exposição à radiação ultravioleta, bactérias do grupo UV e Controle foram processadas para MET, analisadas e classificadas, conforme abaixo, seguindo critérios descritos na seção 4.7 (material e métodos):

1 – Bactérias íntegras: apresentaram membrana plasmática e envoltório celular íntegros, bem como estruturas internas sem alterações aparentes (Fig.19, 20 e 21).

2 – Bactérias danificadas: apresentaram perda parcial da integridade ultraestrutural, exibindo danos em estruturas internas e no envoltório celular (Fig. 22). Além disso, bactérias danificadas apresentaram alterações da morfologia celular que variavam desde pequenas alterações até perda consistente da forma (Fig. 22 A, C e D). Em algumas situações, bactérias danificadas também mostraram alterações da elétron-densidade da matriz citoplasmática, com áreas de condensação citoplasmática (Fig. 22B). Bactérias danificadas foram documentadas em proximidade de bactérias vazias (Fig. 22D).

3 – Bactérias Vazias: apresentaram perda total da integridade ultraestrutural com esvaziamento do conteúdo intracelular (Fig. 23). Algumas bactérias apresentaram-se em processo de esvaziamento celular e outras completamente vazias com regiões amorfas sem similaridade com estruturas citoplasmáticas típicas.

Análises ultraestruturais quantitativas demonstraram que a exposição à radiação UV induziu alterações morfológicas evidentes nas bactérias (Tabela 3). No grupo UV, a maioria das bactérias apresentou alterações morfológicas (danificadas e vazias= 52,38%, Tabela 3). Neste grupo, também foi verificado um aumento considerável na ocorrência de bactérias vazias em comparação com o grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Integridade ultraestrutural de bactérias aquáticas em cultura analisadas por microscopia eletrônica de transmissão após exposição ou não à radiação ultravioleta.

Integridade Celular	Controle (%) <i>n=84</i>	UV (%) <i>n=84</i>
Íntegras	90,48	47,62
Danificadas	3,57	40,48
Vazias	5,95	11,90

5.5.3 Integridade Ultraestrutural x Envoltório Celular

Em bactérias, o conjunto formado pela membrana plasmática e parede celular é comumente chamado de envoltório celular, o qual possui funções na proteção e adaptação destes microrganismos (Silhavy, Kahne e Walker, 2010).

As análises de integridade ultraestrutural demonstraram que a maioria das bactérias com envoltório celular gram-positivo encontrava-se ultraestruturalmente íntegras, em ambos os grupos, controle (Tabela 4; 65,48%) e UV (Tabela 4; 45,24%). Em contrapartida, a maior ocorrência de bactérias com alterações morfológicas (Danificadas+Vazias) no grupo em exposição à radiação UV foi verificada nas gram-negativas (Tabela 4; 30,9%+5,95%= 36,95%).

Tabela 4 - Integridade ultraestrutural de bactérias aquáticas em cultura analisadas por microscopia eletrônica de transmissão relacionadas com tipo de envoltório celular nos grupos UV e Controle.

Tipo de envoltório celular	Controle (n=84)			UV (n=84)		
	Gram-Positivo	Gram-Negativo	Total	Gram-Positivo	Gram-Negativo	Total
Íntegras (%)	65,48	25,00	90,48	45,24	2,38	47,62
Danificadas (%)	1,19	2,38	3,57	9,53	30,95	40,48
Vazias (%)	2,38	3,57	5,95	5,95	5,95	11,9

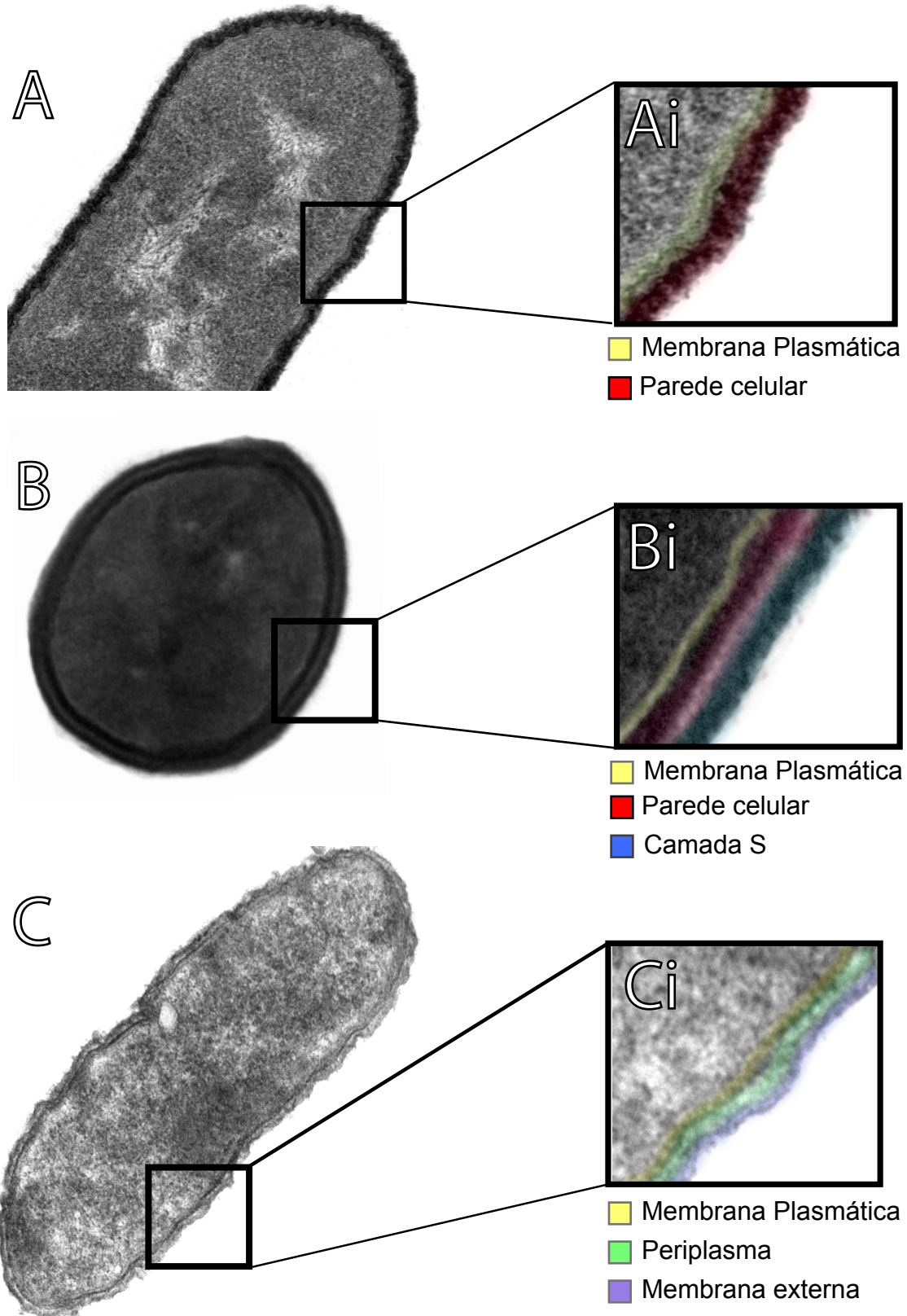


Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão de bactérias aquáticas cultivadas mostrando diferentes tipos de envoltórios celulares. (A e B) Bactérias com envoltórios celulares típicos de bactérias gram-positivas. Em (Ai) e (Bi), observam-se, em maior aumento, detalhes da membrana plasmática (amarelo) e parede celular (vermelho). Note em (Bi), que o envoltório celular apresenta uma estrutura bidimensional externa a parede celular (azul, camada S). Em (C), uma imagem representativa de bactéria gram-negativa. (Ci) mostra o envoltório celular gram-negativo composto por membrana plasmática (amarelo), periplasma (verde) e membrana externa (lilás). Barra, A=250nm; Ai=400nm; B=160nm; Bi=0,36nm; C=200nm e Ci=560nm.

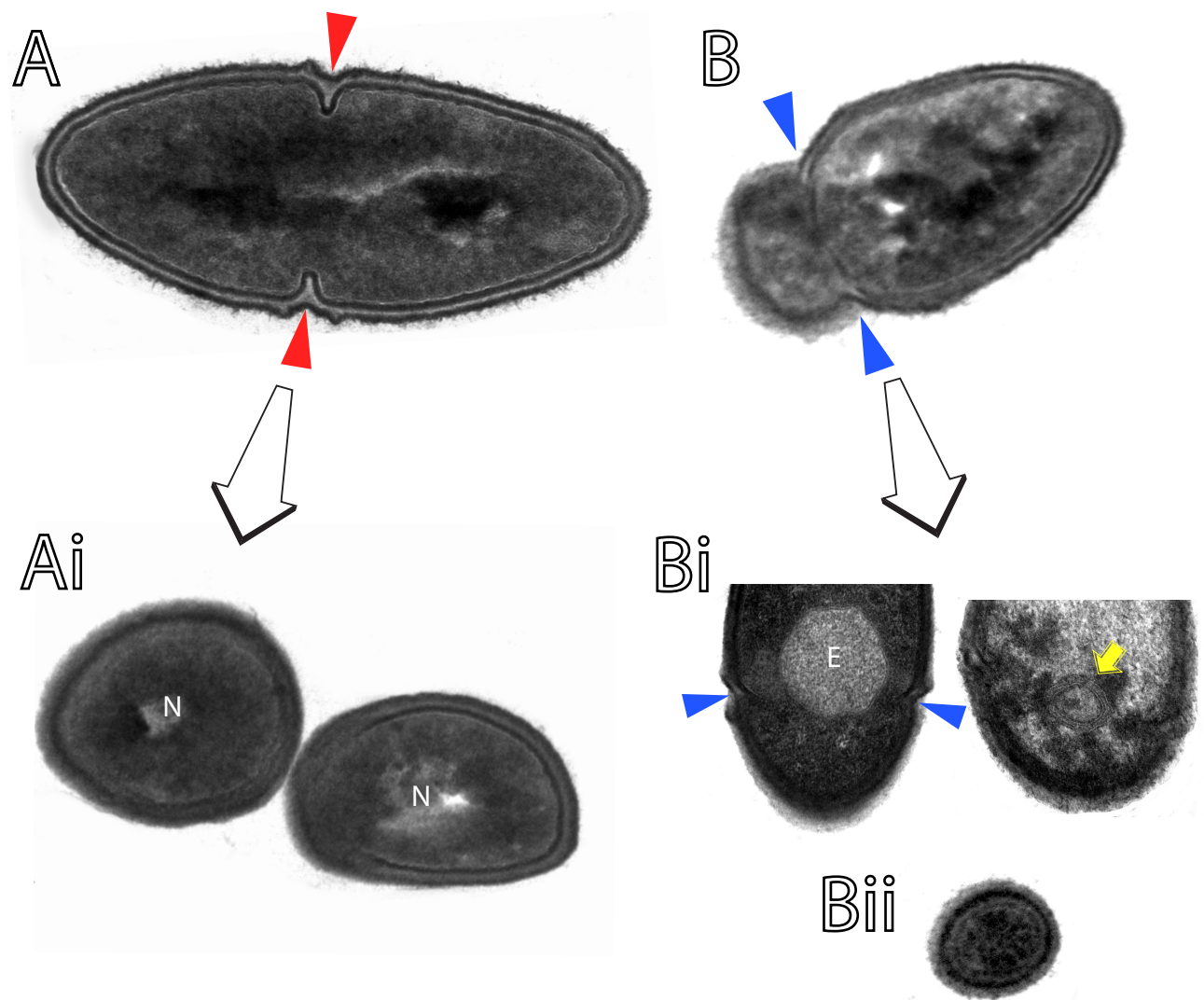


Figura 20 – Ultraestrutura de bactérias aquáticas cultivadas, em processo de divisão celular e esporulação. Em (A) e (C), observam-se bactérias em divisão celular. Note a presença de septos celulares na região mediana da célula (cabeça de seta vermelha). Após o término do processo de divisão celular são originadas duas células iguais, como mostrado em (Ai). Já em (B) e (Bi), observam-se bactérias em processo de esporulação, apresentando septos celulares que dividem a célula assimetricamente (cabeças de setas azuis) e irão formar pré-esporos (seta amarela). Em (Bii) encontra-se um esporo maduro. N, nucleóide. Barra, A=250nm; Ai= 500nm, B=50nm; Bi=312nm e Bii,C=600nm.

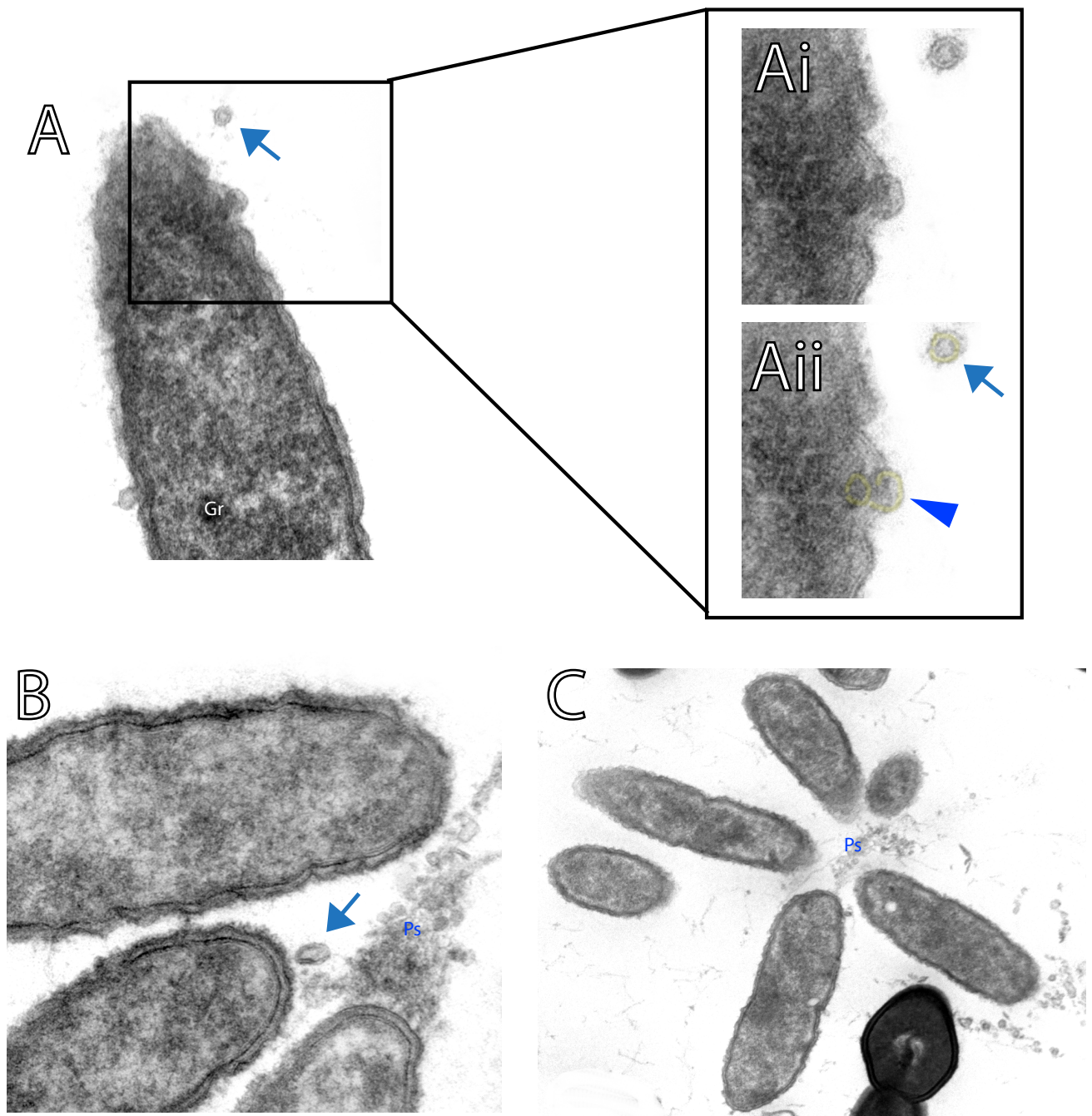


Figura 21 – Bactérias aquáticas em cultura liberam vesículas de secreção a partir da membrana externa. (A-C) Vesículas secretoras (setas) são nitidamente observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Note o aspecto trilaminar da membrana envoltora, destacado em amarelo em (Aii). Estas vesículas são formadas a partir da membrana externa, (Ai e Aii, cabeça de seta). Note em (B) e (C), grupos de bactérias liberando produtos de secreção em uma região do meio extracelular adjacente. (Gr) grânulo eletrodenso. Barra = A= 250nm; Ai =130nm; B=260nm e C= 2 µm.

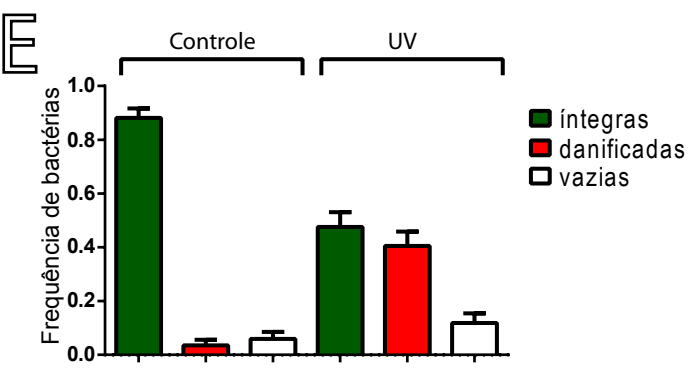
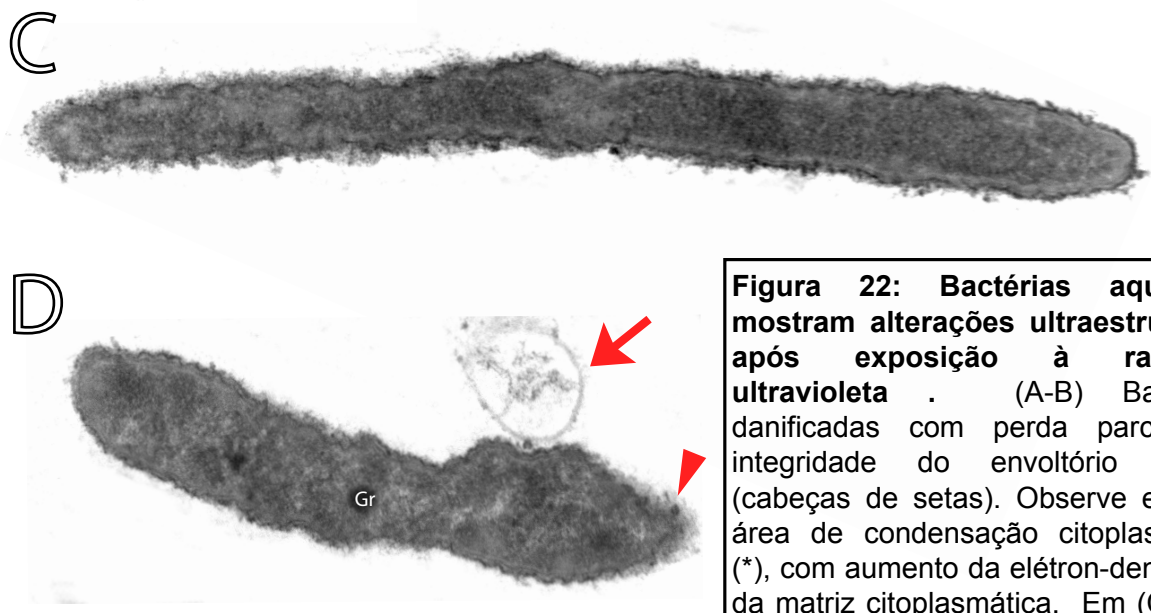
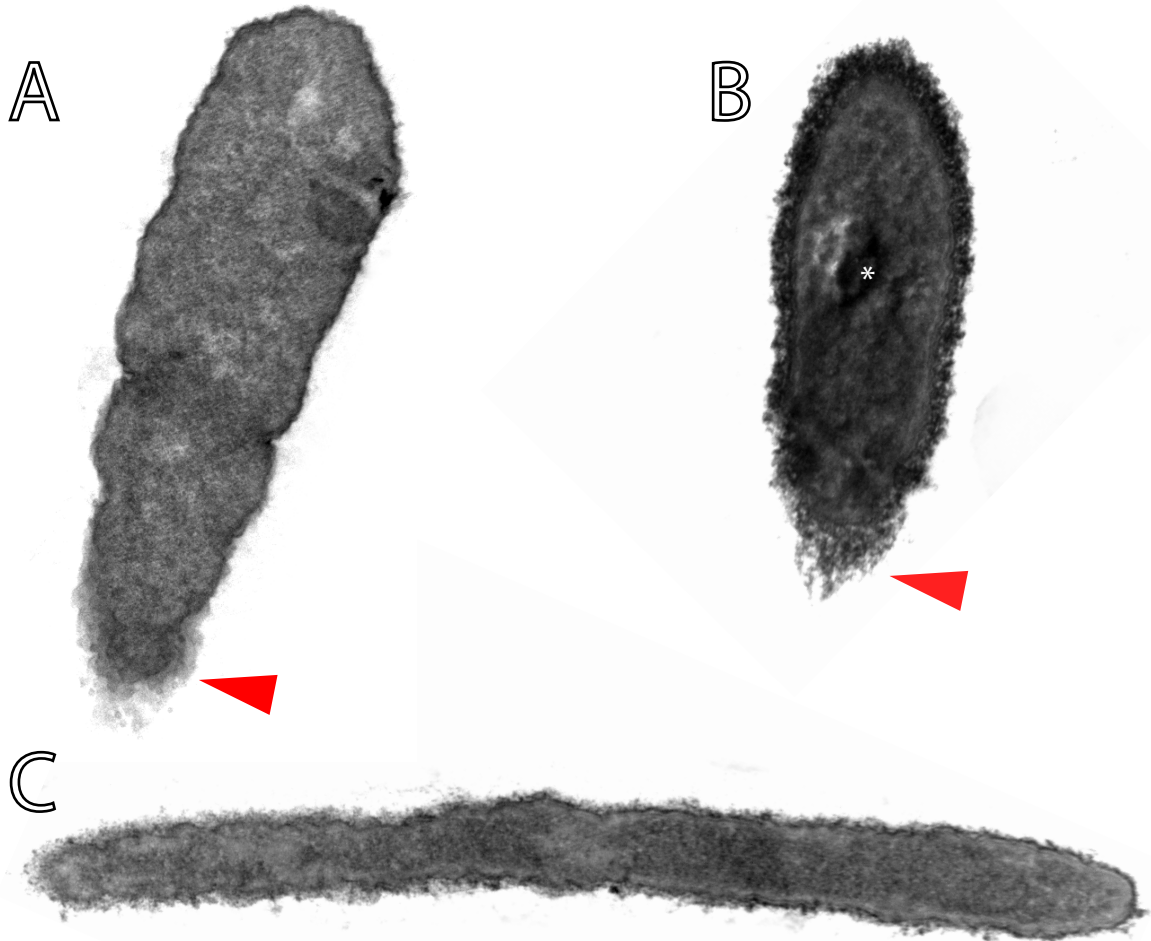


Figura 22: Bactérias aquáticas mostram alterações ultraestruturais após exposição à radiação ultravioleta . (A-B) Bactérias danificadas com perda parcial da integridade do envoltório celular (cabeças de setas). Observe em (B), área de condensação citoplasmática (*), com aumento da elétron-densidade da matriz citoplasmática. Em (C e D), observam-se bactérias com alterações da forma celular. Em (D), observe a associação de uma bactéria danificada com estrutura extracelular amorfa que aparentemente representa uma bactéria vazia (seta). (Gr) grânulo elétron-denso. O gráfico (E) mostra a frequência de bactérias íntegras, danificada e vazias, no grupo submetido à radiação ultravioleta. Barra, A,B,C e D=715nm.

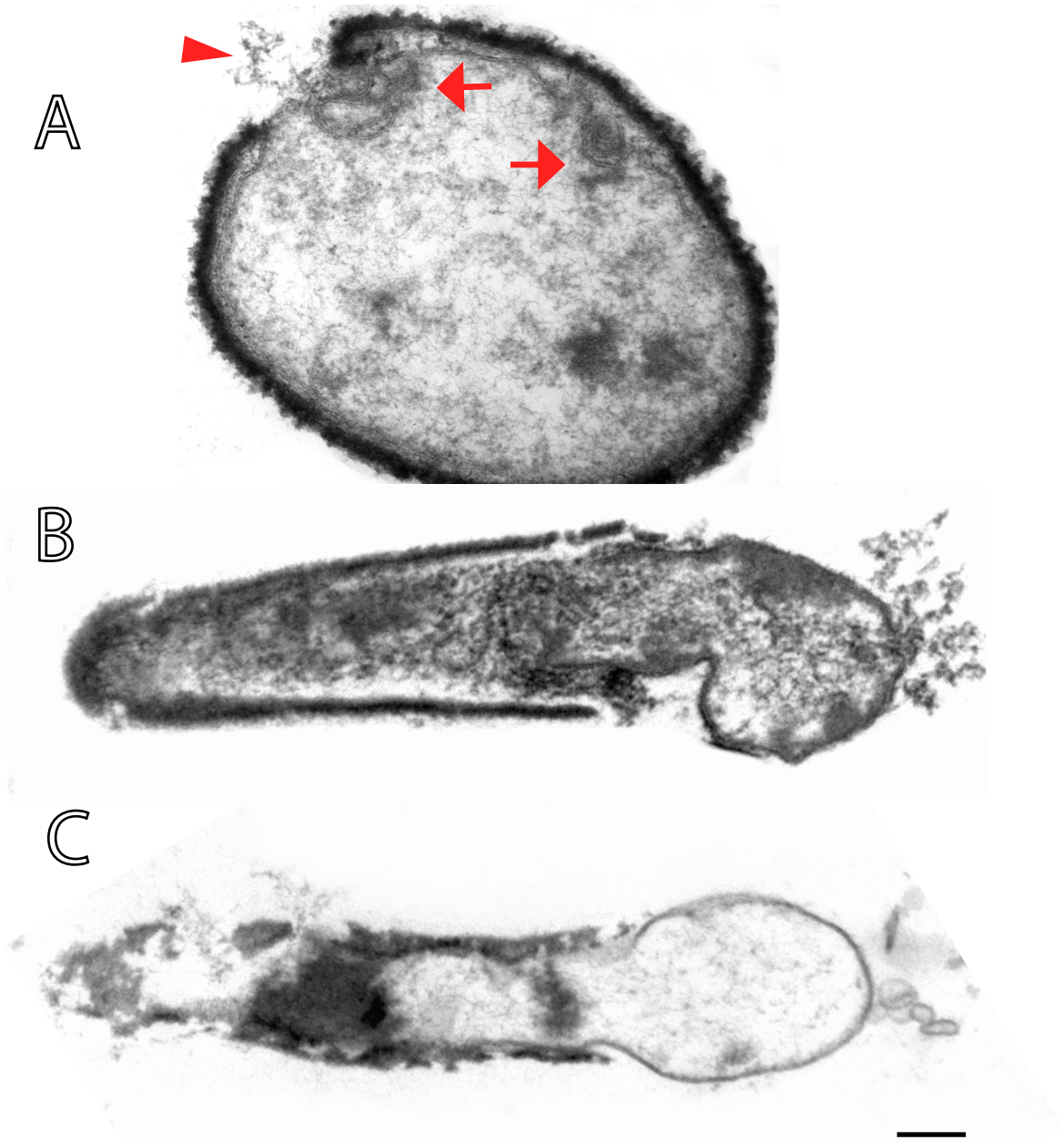


Figura 23: Bactérias aquáticas após exposição à radiação ultravioleta, apresentando perda gradativa da integridade celular. Em (A), observa-se bactéria em processo de esvaziamento do conteúdo celular. Note alterações na membrana plasmática (setas) e rompimento do envoltório celular, com consequente extravasamento de material citoplasmático (cabeça de seta). Em (B), observa-se bactéria em processo mais avançado de degradação e esvaziamento e em (C) bactérias vazias apresentando estruturas amorfas sem similaridade com estruturas citoplasmáticas típicas, mas ainda mantendo parcialmente o formato original. Barra, A=200nm; B=440nm e C=500nm.

6. DISCUSSÃO

6.1 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS

Desde o descobrimento de microrganismos no século XVII, foram feitos progressos substanciais para o entendimento da abundância e diversidade do mundo bacteriano. Esse entendimento foi fundamentado através da utilização de técnicas simples que permitiram o cultivo e estudo de bactérias causadoras de doenças. Tais técnicas, ao longo dos anos, têm sido também usadas para o cultivo de bactérias de diferentes ecossistemas, principalmente com o objetivo de monitoramento da qualidade de água (Fuhrman e Noble, 1995; Rothfield, Taghbalout e Shih, 2005; Silhavy, Kahne e Walker, 2010).

A maioria dos trabalhos envolvendo bactérias aquáticas utiliza amostras coletadas diretamente de ecossistemas aquáticos (Fuhrman e Azam, 1980; Cho e Azam, 1990; Davidson e Van Der Heijden, 2000; Freese, Karsten e Schumann, 2006; Barros *et al.*, 2010). Estas amostras ambientais são rotineiramente processadas para diferentes análises em laboratório. A determinação de parâmetros das comunidades bacterianas naturais, como densidade, produção e biomassa são essenciais para o entendimento das relações ecológicas que ocorrem nos ecossistemas aquáticos (Fuhrman e Azam, 1980; Del Giorgio e Cole, 1998; Freese, Karsten e Schumann, 2006). Tais parâmetros são controlados por diversos fatores físico-químicos e biológicos que influenciam na dinâmica das comunidades bacterianas naturais, como disponibilidade de nutrientes, temperatura, predação, competição, infecção viral e radiação UV (Abreu, Biddanda e Odebrecht, 1992; Fuhrman e Noble, 1995; Wetzel, 2006; Pomeroy *et al.*, 2007; Grossart, 2010). Estes fatores atuam em conjunto nos diferentes ecossistemas aquáticos naturais. 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 trabalho, foram estabelecidas culturas de bactérias aquáticas heterotróficas de água doce através de técnica de diluição seriada, semeadura e isolamento em dois meios de cultura sólidos não seletivos: TSA e R2A. O meio TSA é um meio de cultura mais rico em nutrientes que o meio R2A.

As bactérias cresceram em ambos os meios formando colônias, que foram descritas de acordo com suas características morfológicas. Diferentes morfotipos de colônia foram encontrados nas diluições. Entretanto no meio R2A pôde ser verificado mais morfotipos de colônias (6) do que no meio TSA (2). O meio R2A é amplamente recomendado para crescimento de bactérias heterotróficas de ambientes aquáticos (Apha., 1976). Trabalhos anteriores comparando o crescimento bacteriano em diferentes meios constataram um maior crescimento de bactérias em meio R2A do que em meios de cultura ricos em nutrientes (Apha., 1976; Thompson, Naidu e Pestka, 1985). O meio R2A é, em termos de nutrientes, muito mais pobre que o meio TSA. Desta forma, 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. Portanto, as bactérias das amostras da água quando plaqueadas em um meio mais rico como TSA sofrem possivelmente um choque de nutrientes que limita seu crescimento. Meios de cultura ricos em nutrientes tendem a recuperar baixos números e poucos tipos de bactérias, porém acredita-se que bactérias relacionadas com a qualidade da água, como coliformes e enterobactérias patogênicas, cresçam melhor nestes meios (Thompson, Naidu e Pestka, 1985).

Vale ressaltar que apenas uma pequena porcentagem (0,25%) do número total de bactérias em uma amostra de água doce natural pode ser cultivada por meio de técnicas convencionais (Bernard *et al.*, 2000). Portanto, 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.

Após o estabelecimento das culturas bacterianas em meio sólido, os morfotipos de colônias foram isolados e transferidos para meio líquido não seletivo (TSB) e cultivados à 30°C. O crescimento bacteriano apresenta 4 fases: Lag, exponencial ou Log, estacionária e declínio (Trabulsi e Alterthum, 2004). Estas fases são representadas graficamente por uma curva de crescimento, que podem ser estabelecidas através de vários parâmetros mensuráveis, como: densidade óptica, unidades formadoras de colônia (UFC) e número de bactérias viáveis (Prescott, Harley e Donald, 2002). 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 a

partir da terceira hora. Portanto, determinou-se que a fase estacionária da cultura estudada se dá a partir da terceira hora de crescimento bacteriano no meio TSB à 30°C.

A partir das culturas isoladas, foram transferidas alíquotas para meio TSB e após a terceira hora do crescimento estas foram expostas à radiação ultravioleta por 3h. A cada hora foram analisados os seguintes parâmetros: crescimento bacteriano por densidade óptica, densidade bacteriana e viabilidade celular, além da ultraestrutura por MET (após 3 horas).

6.2 CRESCIMENTO E VIABILIDADE DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS EXPOSTAS À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

6.2.1 Crescimento Bacteriano

Análises da curva de crescimento bacteriano durante a exposição à radiação ultravioleta demonstraram uma queda na densidade bacteriana, quando avaliadas por densidade óptica e densidade de células. É estabelecido que a radiação ultravioleta é um dos fatores que podem atuar afetando o crescimento de bactérias em ecossistemas aquáticos naturais e culturas bacterianas (Aas *et al.*, 1996; Jeffrey *et al.*, 1996). Murphy (2001) verificaram decréscimo significativo na abundância bacteriana no total de bactérias marinhas cultiváveis, quando submetidas à radiação UV. Os efeitos da radiação ultravioleta em bactérias têm relação com a absorção de fótons pelo DNA bacteriano que irá afetar a replicação do DNA e a transcrição do RNA. Em respostas aos danos causados pela radiação UV, as bactérias apresentam mecanismos de reparação variados que, quando falham, levam estes microorganismos à morte (Walker, 1984; Jeffrey *et al.*, 1996; Noyma, Melo e Roland, 2009). Portanto, podemos inferir que o decréscimo da densidade de bactérias nas culturas submetidas à radiação ultravioleta, estava relacionado com a morte celular causada pela exposição essa radiação.

6.2.2 Viabilidade e morte celular de bactérias submetidas à radiação ultravioleta

A avaliação da viabilidade celular é amplamente usada em diferentes estudos de biologia celular e microbiologia para observação, à microscopia de luz, de células funcionalmente alteradas e em processo de morte (D'avila *et al.*, 2006; Fletcher *et al.*, 2009; Davey e Hexley, 2011; Hall, Bondada e Keller, 2011). O uso do kit LIVE/DEAD

BacLight é particularmente indicado para avaliação da viabilidade celular em microorganismos e tornou-se muito usual nos últimos anos devido ao seu procedimento prático e rápida distinção entre células viáveis e não viáveis (Decamp e Rajendran, 1998). Este kit vem sendo utilizado em vários estudos para determinar a viabilidade/inviabilidade, ou seja, vida/morte de bactérias em ambientes naturais e culturas (Decamp e Rajendran, 1998; Boulos *et al.*, 1999; Haglund *et al.*, 2003; Freese, Karsten e Schumann, 2006). No entanto, é a primeira vez que este método foi usado para avaliar a viabilidade celular em bactérias aquáticas cultiváveis de água doce do Reservatório do Funil, um ecossistema tropical.

No presente trabalho, as análises de viabilidade mostraram a ocorrência de morte celular em bactérias em meio de cultura em ambos os grupos: UV e controle. Este resultado encontra-se em acordo com estudo anterior em ecossistemas naturais demonstrando que a morte celular de bactérias é um processo de ocorrência geral (Silva, 2012). Além disso, nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que bactérias de água doce em cultura, provenientes de um ecossistema tropical, são afetadas e morrem quando expostas à radiação UV. De fato, através da microscopia de fluorescência, observou-se variação na quantidade de bactérias viáveis/inviáveis entre os grupos controle e UV e ao longo das três horas analisadas. Estudo sobre a viabilidade celular em bactérias cultiváveis, através da utilização do kit Live/Dead BacLight, também detectou aumento de células inviáveis quando expostas à radiação ultravioleta (Boulos *et al.*, 1999).

Nossos resultados demonstraram que na terceira hora de exposição à radiação ocorreu um aumento significativo de células inviáveis quando comparada com primeira hora de exposição e com o grupo controle. Isto significa que o tempo de exposição à radiação UV pode influenciar na perda da integridade de membrana celular, conforme constatado por Berney *et al.* (2007). Células com membranas não íntegras não podem manter um gradiente eletroquímico que gera o potencial de membrana, podendo ser classificadas como mortas. Portanto, em conjunto com os dados mostrando decréscimo da densidade bacteriana e consequente queda da curva de crescimento, o aumento de células inviáveis, claramente demonstra que a radiação UV induz morte bacteriana.

As análises de viabilidade celular utilizadas no presente trabalho são importantes para o entendimento da dinâmica das comunidades bacterianas submetidas ou não à radiação ultravioleta. Estas análises permitem a detecção de alterações celulares

relacionadas à morte que antecedem à lise celular. Desta forma, em comparação com análises de densidade bacteriana, as quais detectam apenas bactérias íntegras e não íntegras, a avaliação da integridade celular fornece um panorama mais completo sobre o processo de morte bacteriana nos ecossistemas (Silva *et al.*, 2013).

Trabalhos anteriores discutem viabilidade de bactérias expostas à radiação ultravioleta em nível de cultura, através da contagem de UFCs (Knudson, 1985; Helbling *et al.*, 1995; Hoyer, 1998; Cabaj e Sommer, 2000). Porém é bem documentada a existência de um contínuo de estados fisiológicos entre vida e morte bacteriana em ecossistemas aquáticos e uma grande variabilidade em termos de bactérias viáveis/não viáveis e cultiváveis/não cultiváveis (Joux e Lebaron, 2000; Smith e Del Giorgio, 2003; Sawstrom *et al.*, 2008; Romanova e Sazhin, 2011). Desta forma, técnicas que utilizam a contagem de UFCs para mensurar efeitos da radiação UV não levam em consideração células que permanecem viáveis, porém perdem a capacidade de formar novas colônias (não cultiváveis).

Cabe ainda ressaltar com relação à técnica utilizada para as análises de viabilidade, que o processamento das amostras foi feito com uso de citocentrifugação. Em trabalhos anteriores do Grupo, o método de citocentrifugação para preparação das lâminas proporcionou melhor visualização de bactérias aquáticas quando comparado ao método usual (contagem de bactérias sobre a superfície de filtros, após filtração) para análise quantitativa à microscopia de luz (Singh, Häder e Sinha, 2010). No caso da citocentrifugação, as bactérias são visualizadas e contadas diretamente sobre a superfície da lâmina, evitando a formação de background (muito comum em preparações com filtro), além de permitir a preparação rápida das amostras.

6.3 ULTRAESTRUTURA BACTERIANA

Conforme mencionado anteriormente, amostras de bactérias, após três horas de exposição à radiação ultravioleta e controles foram processadas para MET, tendo em vista que este grupo apresentou menor densidade bacteriana e maior ocorrência de células inviáveis. Desta forma, utilizamos a MET como ferramenta para entender melhor aspectos morfológicos ultraestruturais da comunidade das bactérias cultivadas, assim como possíveis alterações ultraestruturais induzidas pela radiação UV. Ressalta-se que a MET vem sendo utilizada para estudo de estruturas de células bacterianas em

ambientes naturais e culturas (Moriarty e Hayward, 1982; Hoppert e Mayer, 1999; Kerfeld, Heinhorst e Cannon, 2010), mas os estudos da ultraestrutura bacteriana em ecossistemas aquáticos ainda é muito pouco conhecida.

6.3.1 Diversidade Ultraestrutural

As análises de MET revelaram bactérias aquáticas apresentando estruturas típicas comumente encontradas em bactérias, como: nucleóide, membrana plasmática, parede celular e grânulos citoplasmáticos. No entanto, chamou atenção a diversidade ultraestrutural das bactérias analisadas, representada por diferenças morfológicas quanto às estruturas bacterianas observadas. A discussão da diversidade ultraestrutural encontrada levará em conta apenas dados obtidos nos grupos controle, uma vez que a ocorrência de estruturas no grupo UV pode estar relacionada com alterações ultraestruturais, discutidos na seção **6.3.2**.

No presente trabalho, foi possível observar bactérias de variados tamanhos (0,93-1.290 μm^2). Comparando os tamanhos das bactérias analisadas com bactérias em ecossistemas aquáticos naturais (dados do grupo de pesquisa em Biologia Celular/UFJF), verificou-se que bactérias em cultura apresentam maior área celular. Este fato pode ser explicado pela adaptação metabólica e fisiológica à alta concentração de nutrientes no meio de cultura e fatores controlados, como temperatura.

Análises ultraestruturais mostraram diferenças evidentes quanto às espessuras e composição de envoltórios celulares bacterianos. Estas diferenças refletem a presença de bactérias gram-positivas e gram-negativas comumente encontradas em ecossistemas aquáticos (Moriarty e Hayward, 1982; Beveridge, 1999; Nevot *et al.*, 2006).

Estruturas capsulares foram observadas em 53,8% das bactérias e apresentaram ampla variação em sua espessura (17-120nm). Esta frequência é maior do que a encontrada em ambientes naturais. Em ecossistemas aquáticos marinhos foram encontradas cápsulas em 7-27% das bactérias analisadas (Cowen, 1992; Stoderegger e Herndl, 2001). Já em ecossistemas aquáticos tropicais amazônicos, foi verificada a frequência de 31,4% (Silva *et al.*, 2013). Estruturas capsulares são importantes para células bacterianas, pois permitem a retenção de agentes tóxicos e proteção à predação (Hahn, Lunsdorf e Janke, 2004), além de absorção e estocagem de nutrientes (Roberts,

1996). Assim a maior ocorrência de cápsulas em culturas pode estar relacionada com maior disponibilidade de nutrientes presentes no meio de cultura.

Uma observação interessante foi a presença de vesículas membranosas secretoras em algumas bactérias. Estas vesículas são formadas a partir da membrana externa e projetavam-se para o meio extracelular adjacente, onde descarregavam seus produtos. Grupos de bactérias liberando produtos vesiculares em uma região comum do meio extracelular também foram observados. Estudos indicam que estas vesículas de membrana externa apresentam conteúdo variado e podem ser essenciais na sobrevivência bacteriana e inibição da lise por infecção viral (Kulp e Kuehn, 2010). Estas vesículas podem conter componentes variados que auxiliam na formação da parede celular, inibem compostos tóxicos do meio (Mcbroom e Kuehn, 2007) e favorecem a formação e estabelecimento de biofilmes (Schooling e Beveridge, 2006). Além disso, podem conter enzimas que contribuem para aquisição de nutrientes (Thompson, Naidu e Pestka, 1985) e autolisinas que degradam outras bactérias, o que poderia favorecê-las na competição por nichos (Li, Clarke e Beveridge, 1998).

Finalmente, corroborando com dados anteriores do grupo que avaliaram a diversidade ultraestrutural de bactérias aquáticas em ambientes naturais (Singh, Häder e Sinha, 2010), ressalta-se que a diversidade morfológica bacteriana vai além do que a simples descrição da forma bacteriana. Os resultados aqui descritos enfatizam o fato das bactérias aquáticas, tanto em ecossistemas naturais quanto em culturas, constituírem organismos complexos o que denota também a complexidade funcional destes microorganismos.

6.3.2 Alterações e Integridade Ultraestrutural

As bactérias submetidas à radiação ultravioleta, analisadas por MET, apresentaram alterações ultraestruturais evidentes, representadas por variação na frequência de estruturas observadas e danos na integridade ultraestrutural, em comparação com o grupo controle.

6.3.2.1 Frequência de estruturas observadas: Grupo Controle x Grupo UV

Análises morfológicas das secções bacterianas obtidas por MET demonstraram que o grupo exposto à radiação ultravioleta apresentou maior ocorrência de bactérias com envoltório celular tipo gram-positivo, composto por membrana plasmática e parede celular. O envoltório celular gram-positivo é menos espesso que o gram-negativo, porém promove uma maior proteção à célula ao estresse osmótico e sua consequente lise (Benson, 1998). Já no envoltório celular gram-negativo, a membrana externa confere uma maior capacidade seletiva de internalização, tornando as bactérias mais resistentes às ações de detergentes, corantes e antibióticos. Desta forma, podemos especular que a presença de maior ocorrência de bactérias com envoltório celular gram-positivo, no grupo exposto à radiação UV, está relacionada com maior proteção à membrana plasmática e estruturas internas. Vale salientar que foi evidente a maior ocorrência de camada S no envoltório celular das bactérias no grupo UV. A camada S é uma estrutura bidimensional externa à parede celular de bactérias gram-positivas (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006). Trabalho anterior não encontrou alterações significativas provocadas pela radiação UV na membrana plasmática de bactérias do gênero *Bacillus*, principal grupo de bactérias que apresentam camada S (Børshem, Bratbak e Heldal, 1990a). Estes dados sugerem que a camada S possa estar atuando como agente protetor da membrana plasmática aos efeitos danosos da radiação UV.

No presente estudo, a ocorrência de cápsula foi maior no grupo UV do que no grupo controle. Em ecossistemas aquáticos, a radiação ultravioleta pode alterar a disponibilidade de nutrientes (Jeffrey *et al.*, 1996), e a cápsula, conforme mencionado anteriormente poderia atuar favorecendo a captação de nutrientes do meio. Além disso, as análises ultraestruturais revelaram que a espessura da cápsula mostrou-se menor no grupo UV em comparação com o controle. Esta redução pode ser explicada pelas alterações na integridade provocadas pela radiação ultravioleta.

Análises das micrografias eletrônicas, mostrando cortes longitudinais de bactérias, permitiram observar septos celulares dividindo a célula bacteriana, com maior ocorrência no grupo UV (50%) em comparação com o grupo controle (14%). Durante a divisão celular formam-se septos na região mediana da célula. Porém em algumas bactérias, foi também observada a formação de septos assimétricos, que podem estar relacionados com eventos de esporulação bacteriana (Ducklow, 2000). A maior

ocorrência de septos no grupo UV pode estar relacionada com a formação de esporos como mecanismo de proteção ao estresse gerado pela radiação UV.

6.3.2.2 Integridade Ultraestrutural

Bactérias aquáticas do grupo UV e controle foram analisadas e categorizadas de acordo a integridade ultraestrutural em íntegras, danificadas ou vazias. Heissenberger, Leppard e Herndl (1996) assumem que somente bactérias com estruturas internas íntegras podem ser consideradas potencialmente ativas. De fato, um dos parâmetros utilizados para caracterizar células vivas e viáveis é a presença de estruturas celulares morfolologicamente identificáveis (Nebe-Von Caron e Badley, 1995). Por outro lado, alterações estruturais são indicativas de danos celulares que podem anteceder processo de morte (Heissenberger, Leppard e Herndl, 1996).

De acordo com as análises de integridade ultraestrutural, a maioria das bactérias analisadas por MET no grupo UV mostraram-se com alterações morfológicas indicativas de morte ou processo de morte (danificadas e vazias, respectivamente), constituindo um total de 52,38%. Este dado corrobora os resultados de viabilidade celular demonstrados pelas contagens por microscopia de fluorescência usando o marcador *BackLight* (38,28%). A diferença encontrada poderia ser justificada pelo fato da MET ser capaz de identificar alterações iniciais de estruturas celulares. O fato é que nossos estudos por MET identificaram uma porcentagem significativa de bactérias alteradas morfolologicamente, o que pode contribuir para se entender a dinâmica da comunidade bacteriana submetida à radiação ultravioleta.

As análises de integridade ultraestrutural apontaram que a maioria das bactérias com envoltório celular gram-positivo encontrava-se íntegras, em ambos os grupos. Porém pode-se observar que no grupo UV, a maioria das bactérias gram-negativas apresentaram alterações morfológicas, encontrando-se vazias ou danificadas. Este fato corrobora com os dados discutidos acima, reforçando novamente a proteção conferida pela parede celular e camada S das bactérias gram-positivas contra danos provocados pela exposição à radiação UV.

Com base nos resultados encontrados pela análise de integridade, em conjunto, foram detectadas alterações celulares indicativas de morte celular. Bactérias danificadas apresentaram alterações da morfologia celular em diferentes graus até perda acentuada

da forma. De fato, foi verificado um aumento da área celular no grupo UV, onde foi possível, inclusive, se observar bactérias com forma alongada, indicando inchaço celular. Este evento pode ter relação com danos na membrana plasmática, que causam aumento da permeabilidade e consequente inchaço da célula anterior à lise (Jeffrey *et al.*, 1996). Sereda, Vandergucht e Hudson (2012) observou alongamento celular em bactérias dividindo, expostas à radiação ultravioleta. Em algumas situações, foi verificado um padrão intracelular electrón-denso em bactérias danificadas, que podem representar áreas de condensação citoplasmática de estruturas internas que estão em processo de degradação. Algumas bactérias apresentaram-se em processo de esvaziamento do conteúdo celular e outras completamente vazias com regiões amorfas sem similaridade com estruturas citoplasmáticas típicas, o que indica bactérias já em processo de lise.

Em resumo, o presente trabalho demonstrou que a irradiação UV induz alterações morfológicas e morte em bactérias aquáticas cultivadas. Além disso, estabelece um modelo de cultura de bactérias aquáticas de água doce, o qual pode contribuir para o entendimento de diferentes aspectos da comunidade bacteriana e para outros estudos de estresses ambientais.

7 CONCLUSÕES

- O uso de diferentes meios de cultura (R2A e TSA) possibilitou o estabelecimento de um modelo de cultura de bactérias aquáticas de água doce, com maior diversidade de morfotipos de colônias encontrada no meio R2A, que foi considerado o mais indicado para o cultivo de bactérias aquáticas. Esse modelo de cultura pode contribuir para o entendimento de diferentes aspectos da comunidade bacteriana e para outros estudos de estresses ambientais.
- A radiação ultravioleta afeta o crescimento bacteriano em cultura, conforme demonstrado pelas análises da curva de crescimento por densidade óptica e densidade bacteriana. Além disso, demonstrou-se que o tempo de exposição à radiação interfere negativamente neste crescimento.
- A radiação ultravioleta induz aumento significativo na mortalidade de bactérias aquáticas cultiváveis. Este aumento, detectado pelas análises da viabilidade celular (*Baclight*), também ocorre em função do tempo de exposição à radiação.
- O uso de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou considerável diversidade ultraestrutural de bactérias aquáticas no modelo de cultura estabelecido, mimetizando a diversidade ultraestrutural encontrada em bactérias de vida livre em ecossistemas aquáticos tropicais (Silva *et al.*, 2013).
- As análises ultraestruturais também demonstraram que a radiação ultravioleta induz alterações morfológicas progressivas em bactérias aquáticas assim como morte desses microorganismos. A radiação ultravioleta também induziu maior frequência de bactérias gram-positivas com camada S e/ou cápsula, o que pode estar relacionada com adaptações morfológicas ao estresse. A maioria das bactérias gram-positivas encontradas no grupo UV estava íntegra, sugerindo papel protetor da camada S à radiação ultravioleta. Em contrapartida, bactérias gram-negativas foram mais afetadas pela radiação ultravioleta. Estes resultados reforçam que bactérias aquáticas em cultura possuem mecanismos de reparo a danos causados pela radiação ultravioleta.

- Ampliando a visão de trabalhos anteriores do Grupo que estudou diferentes parâmetros ligados à morte celular em ambientes aquáticos (Barros *et al.*, 2010; Silva, 2012) os resultados do presente estudo reforçam a importância da análise individual de fatores que interferem diretamente na comunidade bacteriana. Ressalta-se a relevância de se manter culturas de bactérias aquáticas em ambientes controlados para análise pontual de fatores relacionados com a dinâmica da comunidade bacteriana. Além disso, a cultura é fundamental para a obtenção de maior concentração celular o que facilita a investigação das respostas de bactérias aquáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, P. et al. Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 11, n. 3, p. 229-238, 1996. ISSN 0948-3055.

ABREU, P. C.; BIDDANDA, B. B.; ODEBRECHT, C. Bacterial dynamics of the Patos Lagoon estuary, Southern Brazil (32 S, 52 W): relationship with phytoplankton production and suspended material. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 35, n. 6, p. 621-635, 1992. ISSN 0272-7714.

ACKERMANN, H.-W. Bacteriophage taxonomy. **Viruses of Prokaryotes. Tom I**, 2011.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

ANDERSON, J. M. **Ecology for environmental sciences: biosphere, ecosystems and man**. Edward Arnold (Publishers) Ltd., 1981. ISBN 0713128143.

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. **Marine Ecology - Progress Series**, v. 10, p. 257-263, 1983.

BARBEAU, K. et al. Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron (III)-binding ligands. **Nature**, v. 413, n. 6854, p. 409-413, 2001. ISSN 0028-0836.

BARROS, N. O. et al. Virus-Bacterium Coupling Driven by both Turbidity and Hydrodynamics in an Amazonian Floodplain Lake. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 21, p. 7194-7201, 2010.

BEBOUT, B. M.; GARCIA-PICHEL, F. UV B-Induced Vertical Migrations of Cyanobacteria in a Microbial Mat. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 12, p. 4215-4222, 1995. ISSN 0099-2240.

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.

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. ISSN 0948-3055.

BERNEY, M. et al. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 10, p. 3283-90, May 2007.

BEVERIDGE, T. J. Their Derived Membrane Vesicles Structures of Gram-Negative Cell Walls and. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 16, p. 4725-4733, 1999.

BEVERIDGE, T. J.; GRAHAM, L. L. Surface layers of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 55, n. 4, p. 684-705, 1991.

BLACKBURN, N.; FENCHEL, T.; MITCHELL, J. Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2254-2256, 1998. ISSN 0036-8075.

BØRSHEIM, K.; BRATBAK, G.; HELDAL, M. Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 2, p. 352-356, 1990a. ISSN 0099-2240.

_____. Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 2, p. 352-356, 1990b. ISSN 0099-2240.

BOTHWELL, M. L.; SHERBOT, D. M.; POLLOCK, C. M. Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: influence of trophic-level interactions. **Science**, v. 265, n. 5168, p. 97-100, 1994. ISSN 0036-8075.

BOULOS, L. et al. LIVE/DEAD® BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p. 77-86, 1999.

BRACCHINI, L. et al. The Spatial Distribution of Optical Properties in the Ultraviolet and Visible in an Aquatic Ecosystem¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 1, p. 139-149, 2004. ISSN 1751-1097.

BRADLEY, D. E. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. **Bacteriological Reviews**, v. 31, n. 4, p. 230, 1967.

BUSSMANN, I.; PHILIPP, B.; SCHINK, B. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, n. 1, p. 41-50, 2001. ISSN 0167-7012.

CABAJ, A.; SOMMER, R. Measurement of Ultraviolet Radiation with Biological Dosimeters. **Radiation protection dosimetry**, v. 91, n. 1-3, p. 139-142, 2000. ISSN 0144-8420.

CABEEN, M. T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 8, p. 601-10, 2005.

CHAPMAN, S. **A theory of upper-atmospheric ozone**. Edward Stanford, 1930.

CHATILA, K. et al. The responses of a natural bacterioplankton community to different levels of ultraviolet-B radiation: a food web perspective. **Microb Ecol**, v. 41, n. 1, p. 56-68, 2001. ISSN 0095-3628.

CHO, B. C.; AZAM, F. Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone. **Marine ecology progress series. Oldendorf**, v. 63, n. 2, p. 253-259, 1990. ISSN 0171-8630.

CHOI, J. W.; SHERR, B. F.; SHEER, E. B. Dead or Alive? A large fraction of ETS-inactive marine bacterioplankton cells, as assessed by reduction of CTC, can become ETS-active with incubation and substrate addition. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 10, p. 105-115, 1999.

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. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, n. 8, p. 2018-2026, 1988. ISSN 0099-2240.

COWEN, J. P. Morphological study of marine bacterial capsules:
implications for marine aggregates. **Mar. Biol.**, v. 114, p. 85-95, 1992.

D'AVILA, H. et al. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis In Vivo. **J. Immunol.**, v. 176, p. 3087-3097, 2006.

DA, A.; MÉDIO, A. E. PARAÍBA DO SUL E RESERVATÓRIO DO FUNIL. **Maria Isabel de Almeida Rocha**, 2012.

DAVEY, H. M.; HEXLEY, P. Red but not dead? Membranes of stressed Saccharomyces cerevisiae are permeable to propidium iodide. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 163-171, 2011.

DAVIDSON, A.; VAN DER HEIJDEN, A. Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 21, n. 3, p. 257-264, 2000. ISSN 0948-3055.

DE CARVALHO, C. C.; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Mar Drugs**, v. 8, n. 3, p. 705-27, 2010.

DECAMP, O.; RAJENDRAN, N. Assessment of Bacterioplankton Viability by Membrane Integrity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 739-741, 1998.

DEL GIORGIO, P. A.; COLE, J. J. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 503-541, 1998.

DIFFEY, B. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. **Physics in medicine and biology**, v. 36, n. 3, p. 299, 1991. ISSN 0031-9155.

DIFFEY, B. Climate change, ozone depletion and the impact on ultraviolet exposure of human skin. **Physics in medicine and biology**, v. 49, n. 1, p. R1, 2003. ISSN 0031-9155.

DUCKLOW, H. Bacterial Production and biomass in the ocean. In: KIRCHMAN, D. (Ed.). **Microbial Ecology of the Oceans**. New York, EUA: Wiley, 2000.

EHLING-SCHULZ, M.; BILGER, W.; SCHERER, S. UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. **J Bacteriol**, v. 179, n. 6, p. 1940-1945, 1997. ISSN 0021-9193.

ELTSOV, M.; ZUBER, B. Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid. **J Struct Biol**, v. 156, n. 2, p. 246-54, Nov 2006.

ENGELBERG-KULKA, H. et al. Bacterial Programmed Cell Death and Multicellular Behavior in Bacteria. **PLoS Genet**, v. 2, n. 10, p. e135, 2006.

ESPELAND, E.; WETZEL, R. Complexation, stabilization, and UV photolysis of extracellular and surface-bound glucosidase and alkaline phosphatase: implications for biofilm microbiota. **Microb Ecol**, v. 42, n. 4, p. 572-585, 2001. ISSN 0095-3628.

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.

FREUSE, H. M.; KARSTEN, U.; SCHUMANN, R. Bacterial abundance, activity, and viability in the eutrophic River Warnow, northeast Germany. **Microb Ecol**, v. 51, n. 1, p. 117-27, Jan 2006.

FUHRMAN, J. A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. **Nature**, v. 399, p. 541-548, 1999.

FUHRMAN, J. A.; AZAM, F. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. **Appl Environ Microbiol**, v. 39, n. 6, p. 1085-1095, 1980. ISSN 0099-2240.

FUHRMAN, J. A.; NOBLE, R. T. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. **Limnol. Oceanogr.**, v. 40, n. 7, p. 1236-1242, 1995.

GROSSART, H.-P. Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 6, p. 706-714, 2010.

HÄDER, D.-P. **The effects of ozone depletion on aquatic ecosystems.** Academic Press London, 1997. ISBN 0123129451.

HÄDER, D.-P.; SINHA, R. P. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1, p. 221-233, 2005. ISSN 0027-5107.

HADERA, D. et al. Effects on aquatic ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 46, p. 53-68, 1998.

HAGLUND, A.-L. et al. Depth distribution of active bacteria and bacterial activity in lake sediment. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 46, n. 1, p. 31-38, 2003.

HAHN, M. W.; LUNSDORF, H.; JANKE, L. Exopolymer production and microcolony formation by planktonic freshwater bacteria: defence against protistan grazing. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 35, p. 297-308, 2004.

HALL, G. E.; BONDADA, B. R.; KELLER, M. Loss of rachis cell viability is associated with ripening disorders in grapes. **J Exp Bot**, v. 62, n. 3, p. 1145-53, Jan 2011.

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.

HELBLING, E. W. et al. Bacterioplankton viability in Antarctic waters as affected by solar ultraviolet radiation. **Marine Ecology Progress Series**, v. 126, n. 1, p. 293-298, 1995. ISSN 0171-8630.

HENDERSON, S. T. Daylight and its Spectrum. 1977.

HERNDL, G. J.; MULLER-NIKLAS, G.; FRICK, J. Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. **Nature**, v. 361, n. 6414, p. 717-719, 1993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/361717a0> >.

HERNDL, G. J.; MÜLLER-NIKLAS, G.; FRICK, J. Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. 1993.

HIGGINS, M. L.; TSIEN, H. C.; DANEO-MOORE, L. Organization of mesosomes in fixed and unfixed cells. **J. Bacteriol.**, v. 127, n. 3, p. 1519-1523, 1976.

HOPPERT, M.; MAYER, F. Principles of Macromolecular Organization and Cell Function in Bacteria and Archaea. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 31, p. 247-285, 1999.

HOYER, O. Testing performance and monitoring of UV systems for drinking water disinfection. **Water supply**, v. 16, n. 1/2, p. 424-29, 1998. ISSN 0735-1917.

JAGGER, J. NEAR-UV RADIATION EFFECTS ON MICROORGANISMS. **Photochemistry and Photobiology**, v. 34, n. 6, p. 761-768, 1981. ISSN 1751-1097.

JEFFREY, W. et al. Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. **Marine Ecology Progress Series**, v. 137, n. 1, p. 283-291, 1996. ISSN 0171-8630.

JORDAN, B. R. The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. **Advances in botanical research**, v. 22, p. 97-162, 1996. ISSN 0065-2296.

JOUX, F.; LEBARON, P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1523-1535, 2000.

KALFF, J. **Limnology**. New York: Prentice Hall, 2001.

KARENTZ, D. Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. **Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects**, p. 93-110, 1994. ISSN 1118667948.

KERFELD, C. A.; HEINHORST, S.; CANNON, G. C. Bacterial microcompartments. **Annu Rev Microbiol**, v. 64, p. 391-408, 2010.

KLUG, J. L. Bacterial response to dissolved organic matter affects resource availability for algae. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 62, n. 2, p. 472-481, 2005. ISSN 0706-652X.

KNUDSON, G. B. Photoreactivation of UV-irradiated *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. **Appl Environ Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 975-980, 1985. ISSN 0099-2240.

KULP, A.; KUEHN, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annu Rev Microbiol**, v. 64, p. 163-84, 2010.

LAYBOURN-PARRY, J.; PARRY, J. Flagellates and the microbial loop. **SYSTEMATICS ASSOCIATION SPECIAL VOLUME**, v. 59, p. 216-239, 2000. ISSN 0309-2593.

LEECH, D. M.; JOHNSEN, S. Behavioral responses—UVR avoidance and vision. **UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Comprehensive series in photochemistry & photobiology. Royal Society of Chemistry**, p. 455-481, 2003.

LEWIS, K. Programmed Death in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 503-514, 2000.

LI, Z.; CLARKE, J.; BEVERIDGE, T. J. Gram-Negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 20, p. 5478-5483, 1998.

LINDELL, M. J.; GRANÉLI, W.; TRANVIK, L. J. Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 1, p. 195-199, 1995. ISSN 0024-3590.

LINDEMAN, R. L. The trophic dynamic aspect of ecology. **Ecology**, v. 23, n. 4, p. 399-417, 1942.

MARANGER, R.; DEL GIORGIO, P. A.; BIRD, D. F. Accumulation of damaged bacteria and viruses in lake water exposed to solar radiation. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 28, n. 3, p. 213-227, 2002. ISSN 0948-3055.

MARGALEF, R. **Limnología**. Omega Barcelona, 1983. ISBN 8428207143.

MCBROOM, A. J.; KUEHN, M. J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. **Mol Microbiol**, v. 63, n. 2, p. 545-58, 2007.

MELO, R. C. N. et al. Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function, and Current Imaging Techniques. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 59, p. 540-556, 2011.

MELO, R. C. N. et al. Histological approaches for high-quality imaging of zooplanktonic organisms. **Micron**, v. 38, n. 7, p. 714-721, 2007.

MIILLER-NIKLAS, G. et al. Ultraviolet-B radiation and bacterial metabolism in coastal waters. **Aquat Microb Ecol**, v. 9, p. 111-116, 1995.

MITCHELL, D. L.; KARENTZ, D. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. **Environmental UV photobiology**, p. 345-377, 1993.

MITTLER, R.; TEL-OR, E. Oxidative stress responses in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. **Free Radical Research**, v. 13, n. 1, p. 845-850, 1991. ISSN 1071-5762.

MOLINA, M. J.; ROWLAND, F. S. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. **Nature**, v. 249, n. 28, p. 810-812, 1974.

MONTZKA, S. et al. Controlled substances and other source gases, Chapter 1 of the Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2002. **Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2002**, 2003.

MORIARTY, D. J. W.; HAYWARD, A. C. Ultrastructure of Bacteria and the Proportion of Gram-Negative Bacteria in Marine Sediments. **Microb Ecol**, v. 8, p. 1-14, 1982.

MOSTAJIR, B. et al. Ecological implications of changes in cell size and photosynthetic capacity of marine Prymnesiophyceae induced by ultraviolet-B radiation. **Marine Ecology Progress Series**, v. 187, p. 89-100, 1999. ISSN 0171-8630.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, p. 325-438, 2001.

MURPHY, D. J. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 541-585, 2012. ISSN 0033-183X.

NEBE-VON CARON, G.; BADLEY, R. A. Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. **Journal of Microscopy - Oxford**, v. 179, p. 55-66, 1995.

NEUHAUS, F. C.; BADDILEY, J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, p. 686-723, 2003.

NEVOT, M. et al. Ultrastructural analysis of the extracellular matter secreted by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. **Microb Ecol**, v. 51, n. 4, p. 501-7, May 2006.

NICHOLS, C. A.; GUEZENEC, J.; BOWMAN, J. P. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. **Mar Biotechnol (NY)**, v. 7, n. 4, p. 253-271, 2005.

NOYMA, N. P.; MELO, R. C. N.; ROLAND, F. **Avaliação da ultraestrutura e morte celular em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cianobacteria) sob efeito da radiação ultravioleta**. 2009. (Dissertação de Mestrado). Pós Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

PAKULSKI, J. et al. Influence of light on bacterioplankton production and respiration in a subtropical coral reef. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 14, n. 2, p. 137-148, 1998. ISSN 0948-3055.

PEAK, M.; PEAK, J. Molecular photobiology of UVA. **The Biological Effects of UVA Radiation**, p. 42-52, 1986.

POGLIANO, J. The bacterial cytoskeleton. **Current opinion in cell biology**, v. 20, n. 1, p. 19-27, 2008.

POMEROY, L. R. et al. The microbial loop. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 28-33, 2007.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Current science**, v. 85, n. 9, p. 1299-1307, 2003. ISSN 0011-3891.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, P. J.; DONALD, A. K. **Microbiology**. 5ª ed. The MacGraw-Hill Companies, 2002.

PROCTOR, L. M.; FUHRMAN, J. A. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. **Nature**, v. 343, p. 60-62, 1990.

REAVELY, D. A.; BURGE, R. E. Walls and membranes in bacteria. In: A.H. ROSE, D. W. T. (Ed.). **Advances in microbial physiology**. New York: Academic Press Inc, v.7, 1972. p.1-81.

ROBERTS, I. S. The Biochemistry and Genetics of Capsular Polysaccharide Production in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 285-315, 1996.

ROMANOVA, N. D.; SAZHIN, A. F. Methodological aspects of the determination of the Bacterioplankton number, biomass, and production. **Oceanology**, v. 51, n. 3, p. 518-527, 2011.

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. ISSN 1740-1526.

SANCAR, A.; SANCAR, G. B. DNA repair enzymes. **Annual review of biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 29-67, 1988. ISSN 0066-4154.

SAWSTROM, C. et al. Influence of environmental conditions, bacterial activity and viability on the viral component in 10 Antarctic lakes. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 63, n. 1, p. 12-22, 2008.

SCHOOLING, S. R.; BEVERIDGE, T. J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. **J Bacteriol**, v. 188, n. 16, p. 5945-57, Aug 2006.

SEREDA, J. M.; VANDERGUCHT, D. M.; HUDSON, J. J. In Situ UVA Exposure Modulates Change in the Uptake of Radiophosphate in Size-Fractionated Plankton Assemblages Following UVR Exposure. **Microb Ecol**, v. 63, n. 4, p. 751-760, 2012. ISSN 0095-3628.

SERVAIS, P.; BILLEN, G.; REGO, J. V. Rate of Bacterial Mortality in Aquatic Environments. **Appl Environ Microbiol**, v. 49, n. 6, p. 1448-1454, 1985.

SHERR, E.; SHERR, B. Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. **Limnology and Oceanography**, p. 1225-1227, 1988. ISSN 0024-3590.

SHIH, Y. L.; ROTHFIELD, L. The bacterial cytoskeleton. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 70, n. 3, p. 729-54, 2006.

SHIVELY, J. M. Inclusion Bodies of Prokaryotes. **Annu Rev Microbiol**, v. 28, p. 167-187, 1974.

SIKKEMA, J.; DE BONTE, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **American Society for Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

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

SILVA, T. **Avaliação do processo de morte celular em bactérias aquáticas em dois modelos de ecossistemas aquáticos tropicais**. 2012. Biologia Celular, Universidade Federal de Juiz de Fora

SILVA, T. et al. Visualizing aquatic bacteria by light and transmission electron microscopy. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-14, 2013/10/17 2013. ISSN 0003-6072. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1007/s10482-013-0047-6> >.

SINGEE, D. C. **Freshwater Microbiology - Biodiversity And Dynamic Interactions Of Microorganisms In The Aquatic Environment**. England: Jon Wiley & Sons LTDA, 2005.

SINGH, S. P.; HÄDER, D.-P.; SINHA, R. P. Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. **Ageing research reviews**, v. 9, n. 2, p. 79-90, 2010. ISSN 1568-1637.

SMITH, E. M.; DEL GIORGIO, P. A. Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities? **Aquatic Microbial Ecology**, v. 31, p. 203-208, 2003.

SOMMARUGA, R. The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 62, n. 1, p. 35-42, 2001. ISSN 1011-1344.

STEINBUCHER, A. et al. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 94-105, 1995.

STODEREGGER, K. E.; HERNDL, G. J. Visualization of the exopolysaccharide bacterial capsule and its distribution in oceanic environments. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 26, p. 195--199, 2001.

STUKALOV, O. et al. Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 17, p. 5457-65, 2008.

SUHETT, A. L. et al. O papel da foto-degradação do carbono orgânico dissolvido (COD) nos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 10, n. 2, p. 186-204, 2009.

THOMPSON, S. S.; NAIDU, Y. M.; PESTKA, J. J. Ultrastructural Localization of an Extracellular Protease in *Pseudomonas fragi* by Using the Peroxidase-Antiperoxidase Reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 1038-1042, 1985.

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

TWORT, F. W. AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. **The Lancet**, v. 186, n. 4814, p. 1241-1243, 1915. ISSN 0140-6736.

WALKER, G. C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 1, p. 60, 1984.

WANG, L.; MILLER, T.; PRISCU, J. Bacterioplankton nutrient deficiency in a eutrophic lake. **Archiv fuer Hydrobiologie AHYBA 4**, v. 125, n. 4, 1992.

WEBB, A. et al. **UV effects in aquatic organisms and ecosystems**. Royal Society of Chemistry, 2003. ISBN 0854043012.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiol Rev**, v. 28, n. 2, p. 127-81, 2004.

WENNY, B.; SAXENA, V.; FREDERICK, J. Aerosol optical depth measurements and their impact on surface levels of ultraviolet-B radiation. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres (1984–2012)**, v. 106, n. D15, p. 17311-17319, 2001. ISSN 2156-2202.

WETZEL, R. G. Death, detritus, and energy flow in aquatic ecosystems. **Freshwater Biology**, v. 33, n. 1, p. 83-89, 2006. ISSN 1365-2427.

WILHELM, S. W. et al. UV radiation induced DNA damage in marine viruses along a latitudinal gradient in the southeastern Pacific Ocean. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2003. ISSN 0948-3055.

WILHELM, S. W.; SUTTLE, C. A. Viruses and nutrient cycles in the sea. **Bioscience**, v. 49, n. 10, p. 781-788, 1999.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H. C. **What are bacterial extracellular polymeric substances?** Microbial Extracellular Polymeric Substances. WINGENDER, J.; NEU, T. R., et al. Berlin, Alemanha: Springer 1999.

YODER, K. E.; BUSHMAN, F. D. Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. **Journal of virology**, v. 74, n. 23, p. 11191-11200, 2000. ISSN 0022-538X.

YURKOV, V. V.; BEATTY, J. T. Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria. **Microb. Mol. Biol.**, v. 62, n. 3, p. 695-724, 1998.

ZEPP, R. et al. Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 286-300, 2007.

ZEPP, R. G.; CALLAGHAN, T. V.; ERICKSON, D. J. Effects of increased solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. **Ambio**, v. 24, n. 3, p. 181-7, 1995. ISSN 0044-7447.

ANEXO

Durante o desenvolvimento do trabalho, com participação na autoria, foi publicado o artigo intitulado: “Vizualizing aquatic bactéria by light and electron microscopy” na revista *Antonie Van Leeuwenhoek – Journal of Microbiology*, que se encontra dentro do escopo do presente estudo.