

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

Victor Claudio Zarantonello Arantes

**ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE CIANOBACTÉRIAS
(*Cylindrospermopsis raciborskii* E *Microcystis aeruginosa*) EM
INTERAÇÃO INTERESPECÍFICA COM ÊNFASE EM
CORPÚSCULOS LIPÍDICOS**

**JUIZ DE FORA
2015**

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

Victor Claudio Zarantonello Arantes

**ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE CIANOBACTÉRIAS
(Cylindrospermopsis raciborskii E Microcystis aeruginosa) EM
INTERAÇÃO INTERESPECÍFICA COM ÊNFASE EM
CORPÚSCULOS LIPÍDICOS**

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
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Zarantonello Arantes, Victor Claudio.

Alterações ultraestruturais de cianobactérias (*Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*) em interação interespecífica com ênfase em corpúsculos lipídicos / Victor Claudio Zarantonello Arantes. -- 2015.

88 f. : il.

Orientadora: Rossana Corrêa Netto de Melo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ecologia, 2015.

1. Cianobactérias. 2. Cultura de cianobactérias. 3. Corpúsculos lipídicos. 4. Ultraestrutura de cianobactérias. 5. Interação interespecífica. I. Corrêa Netto de Melo, Rossana , orient. II. Título.

**“ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE CIANOBACTÉRIAS
(CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII E MICROCYSTIS AERUGINOSA) EM
INTERAÇÃO INTERESPECÍFICA COM ÊNFASE EM CORPÚSCULOS
LIPÍDICOS”**

Victor Claudio Zarantonello Arantes

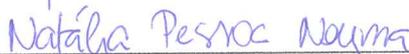
Orientadora: Dr.^a Rossana Corrêa Netto de Melo

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

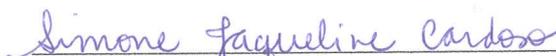
Aprovado em 25 de setembro de 2015.



Prof.^a Dr.^a Rossana Corrêa Netto de Melo
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Dr.^a Natália Pessoa Noyma
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ



Dr.^a Simone Jaqueline Cardoso
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Para a flor mais linda que desabrocha hoje longe de mim.

Cuidei, reguei, cultivei e sei que hoje cada pétala sua
servirá para perfumar todos os caminhos da minha vida.

A você, Nana.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas boas energias, pela sabedoria, pela paciência e pelas barreiras que me fizeram crescer e concluir essa etapa.

À minha família: meus pais, minha irmã... que não estão vendo o fim desse ciclo neste plano que conhecemos no momento, mas tenho certeza que me ajudam onde quer que estejam, e se estou hoje tentando ser o melhor homem que posso, seja no âmbito pessoal ou profissional, é para honrar tudo o que me foi ensinado. Meu amor por vocês é eterno!

À minha orientadora, Rossana Melo pelas oportunidades, pelo conhecimento, pela orientação, mas principalmente pela confiança em mim mantendo sempre as portas abertas para que eu possa evoluir cada vez mais. Você é e sempre será um exemplo a ser seguido. Obrigado por tudo!

Ao Prof. Fábio Roland pelo incentivo, pois em momentos pontuais soube dizer o que eu precisava ouvir para me manter forte e focado. Agradeço também ao pessoal do LEA, principalmente ao Gladson e aos que trabalham com o cultivo pela infraestrutura e ajuda.

Ao Prof. Hélio Chiarini-Garcia e ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) por permitir e colaborar na obtenção das imagens de microscopia eletrônica.

Às professoras que compõem minha banca, Natália Pessoa Noyma e Simone Jaqueline Cardoso, pelo tempo e atenção dispendidos ao avaliarem meu trabalho no intuito de torná-lo melhor e aprimorar meu desempenho como pesquisador. Obrigado por fazerem parte direta da conclusão dessa etapa!

Agradeço, de todo o meu coração e alma, aos meus irmãos acadêmicos e de vida, Thiago Pereira da Silva e Juliana Gamalier de Paiva, que estiveram presentes em toda a trajetória dessa dissertação, dividindo comigo todos os conhecimentos que já possuíam. Vocês são peça fundamental do meu caminho como pesquisador. Obrigado por serem meu suporte nos momentos mais difíceis e não me deixar fraquejar. O pouco que sei hoje, e o que posso vir a saber amanhã, sempre será graças a essa amizade que construímos.

Aos meus outros companheiros e amigos de laboratório (Daniel, Eduardo, Lívia Andressa, Kennedy, Kátia, Kássia, Aline, Lívia Teixeira) por fazerem o nosso

dia a dia cada vez mais agradável e tornar o “lab” muito mais que apenas um local de trabalho.

À minha amiga, Mariana Mello, que me auxiliou bastante no início dessa pesquisa e se dedicou muito, mesmo com a iminente viagem. Você é uma pessoa especial com quem construí algo importante desde a graduação.

Assim como o Felipe Augusto (Fester) que mesmo com o seu jeito inusitado sempre foi presente e me deu força e incentivo mais que suficientes para minha progressão.

À minha tia Márcia, minhas primas Amanda e Maria Paula, pelo carinho e por sempre darem-me mais crédito do que eu mereço e confiarem cegamente no meu sucesso.

Aos amigos que não pertencem ao meio científico, mas que sempre me apoiaram e, mesmo sem conhecimento acadêmico, acreditaram em mim e deram força para continuar trilhando meu caminho (Tia Irene, Tio Zé I, Tio Zé II, Raquel, Tia Ana e todos da família Pereira da Silva, Lucas, Bruno, Aline, Tio Nelson, Lulu, Person e Luís).

RESUMO

Cianobactérias são microrganismos unicelulares fotossintetizantes responsáveis pela maior parte da produção primária em ecossistemas aquáticos. Em diversos ambientes, várias espécies de cianobactérias causam florações, liberando toxinas que são nocivas para outras comunidades. Também é comum que haja dominância de uma determinada espécie de cianobactéria, podendo esta ser alternada ao longo de períodos sazonais. Dessa forma, há uma interação natural entre espécies diferentes de cianobactérias na qual se observa mudanças no comportamento das mesmas para que possam suprimir suas competidoras e assim dominar o ambiente. Diversos estudos têm avaliado interações entre cianobactérias a nível populacional, porém, poucos investigam aspectos fisiológicos, metabólicos e ultraestruturais das células durante esse processo.

Corpúsculos lipídicos (CLs), também conhecidos como gotas ou inclusões lipídicas, são organelas presentes em todos os tipos celulares, incluindo cianobactérias. Em células eucarióticas, estas organelas estão envolvidas em várias funções celulares como metabolismo de lipídios, sinalização celular, transporte intracelular e inflamação. Estudos do grupo de Biologia Celular/UFJF vêm estudando a formação e o papel de CLs em células de mamíferos e, mais recentemente, em protozoários parasitos unicelulares. CLs mostram-se como organelas funcionalmente ativas podendo ser rapidamente formados em respostas a estímulos do meio independente do tipo celular envolvido. A ocorrência e o papel de CLs em cianobactérias são pouco conhecidos. Trabalho anterior do grupo identificou, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), alteração no número de CLs em cianobactérias submetidas à radiação ultravioleta.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a ultraestrutura de cepas de cianobactérias, *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYRF-01) e *Microcystis aeruginosa* (MIRF-01) em interação durante 24h e investigar se esta influencia a formação de CLs. Amostras dos grupos controles (MIRF-01 e CYR-01) e do grupo interação (MIRF-01/CYRF-01) foram coletadas no tempo 0h e 24h. Para análises e quantificação do CLs foram utilizados: (1) coloração com Oil Red-O, que possibilita a marcação e visualização de CLs tanto em microscopia de campo claro como de fluorescência e (2) MET, a qual possibilita a identificação de aspectos morfológicos em alta resolução. Em paralelo, foram analisadas a densidade e viabilidade das

células, através do uso de quantificação de rotina em câmara de Neubauer e uso de marcador para permeabilidade de membrana, respectivamente.

Os resultados, tanto na microscopia de luz, quanto em MET, indicaram uma redução significativa de CLs ($p < 0,001$), nas duas espécies, após a interação de 24hs quando comparadas com os grupos controle. Porém, foi observada uma redução mais acentuada no número de CLs, em paralelo com aumento de tamanho, em CYRF-01 em relação à MIRF-01. Desta forma, nossos dados sugerem que CLs em cianobactérias são organelas dinâmicas, capazes de responder a estresses ambientais, como na competição interespecífica e com funções que podem ir além de simples armazenamento energético. Além de CLs, outras estruturas e organelas foram analisadas e quantificadas, como vesículas de membrana externa (VMEs), grânulos de polifosfato, carboxissomos e tilacoides. Estas análises demonstraram que CYRF-01 parece responder mais prontamente a estímulos do meio, pois somente ela apresentou formação de VMEs. Além disso, a proporção destas vesículas aumentou significativamente nas células de *C. raciborskii* no grupo interação ($p < 0,004$). Paralelamente, também em CYRF-01, os grânulos de fosfato tiveram uma menor proporção na interação em relação ao seu controle ($p = 0,014$), bem como uma menor porcentagem de área ocupada por tilacoides ($p < 0,0001$). Valores esses que em MIRF-01 não foram estatisticamente significativos ($p = 0,589$ e $p = 0,921$). A interação não alterou a densidade celular ($p = 0,811$), entretanto, as análises de viabilidade celular mostraram que na interação há maior quantidade de células inviáveis nas duas cepas ($p < 0,05$ em ambas). Porém, houve maior quantidade de células inviáveis, proporcionalmente, em MIRF-01 ($10,81 \pm 3,11\%$) que em CYRF-01 ($7,74 \pm 1,47\%$), após a interação.

Coletivamente, os resultados deste estudo reforçam a importância da análise individual de fatores, como interações interespecíficas, que interferem diretamente na comunidade de cianobactérias. Este tipo de interação induz alterações a nível celular nas espécies envolvidas. Portanto, o melhor entendimento dessas respostas é importante na compreensão da dinâmica da comunidade desses organismos e suas relações em ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: cianobactérias, cultura, corpúsculos lipídicos, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de luz, ultraestrutura, interação interespecífica, vesículas de membrana externa.

ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic unicellular microorganisms responsible for most of the primary production in aquatic ecosystems. In many environments, several species of cyanobacteria cause blooms and release toxins that are harmful to other communities. In many places, it is common that there is dominance of a particular species of cyanobacteria, which may be switched over seasonal periods. Thus, there is a natural interaction between different species of cyanobacteria in which we observe changes in the behavior of the same so that they can suppress their competitors and thus dominate the environment. Several studies have evaluated interactions between cyanobacteria at the population level, but few ones investigate physiological, metabolic and ultrastructural aspects of the cells during this process.

Lipid bodies (LBs), also known as lipid droplets or inclusions, are organelles present in all cell types, including cyanobacteria. In eukaryotic cells, these organelles are involved in varied cellular functions such as lipid metabolism, cellular signaling, intracellular transport and inflammation. The Cell Biology at UFJF has been studying the formation and the role of LBs in mammalian cells and, more recently, in unicellular protozoan parasites. LBs are functionally active organelles, which can be rapidly formed in response to stimuli independent of the cell type involved. The occurrence and the functional role of LBs in cyanobacteria are poorly known. Previous work of our group has identified by TEM that the number of LBs within cyanobacteria changed in response to ultraviolet radiation.

The present work aimed to study the ultrastructure of cyanobacteria strains *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYRF-01) and *Microcystis aeruginosa* (MIRF-01) in interaction for 24h and investigate whether this interaction affects the formation of LBs. Samples of the control groups (MIRF-01 and CYR-01) and interaction group (MIRF-01/CYRF-01) were collected at 0h and 24h. For analysis and quantification of LBs we used: (1) Oil Red-O staining, which enables visualization of LBs by both bright-field and fluorescence microscopy and (2) TEM, which provides identification of morphological aspects of LBs at high resolution. In parallel, we analyzed the density and cell viability through routine quantification with a Neubauer chamber and a membrane permeability marker, respectively.

The results in both light microscopy and TEM showed a significant reduction in LB numbers ($p < 0.001$) for the two species after 24h of interaction compared with the control groups. However, it was observed a greater reduction in the number of LBs in

parallel to the increase in size in CYRF-01 compared to MIRF-01. Thus, our data suggest that LCs in cyanobacteria are dynamic organelles, able to respond to environmental stresses, as in interspecific competition and with features that can go beyond just energy storage. IN addition to CLs, other organelles and structures were analyzed and quantified such as external membrane vesicles (EMVs), polyphosphate granules, carboxysomes and thylakoid membranes. These analyses demonstrated that CYRF-01 seems to be much more responsive to environmental stimuli, since just this cyanobacterium released EMVs. Furthermore, the proportion of EMVs significantly increased in *C. raciborskii* cells after 24h of interaction ($p < 0.004$). In parallel, the numbers of phosphate granules reduced in response to interaction compared to the control group ($p = 0.014$) as well as the area occupied by thylakoids ($p < 0.0001$). Values found in MIRF-01 were not statistically significant ($p = 0.589$ and $p = 0.921$). The interaction did not affect cell density ($p = 0.811$), however, cell viability analysis showed that the interaction there is a higher quantity of non-viable cells in both strains ($p < 0.05$ in both). However, there is a greater amount of non-viable cells, in proportion in MIRF-01 ($10.81 \pm 3.11\%$) than in CYRF-01 ($7.74\% \pm 1.47$) after the interaction.

Collectively, the results of this study reinforce the importance of individual analysis of factors such as interspecific interactions that interfere directly in cyanobacteria community. This kind of interaction induces changes at the cellular level in the species involved. Therefore, a better knowledge of these responses is important to understand the community dynamics of these organisms and their relationships in aquatic ecosystems.

Key-words: cyanobacteria, culture, lipid droplets, transmission electron microscopy, light microscopy, ultrastructure, interespecific interaction, external membrane vesicles.

INDICE DE ABREVIATURAS

ADRP	Proteína de diferenciação do tecido adiposo
CLs	Corpúsculos lipídicos
CP	Corpos poliédricos
CYRF-01	Cepa de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> utilizada no trabalho
GP	Grânulos de polifosfato
MIRF-01	Cepa de <i>Microcystis aeruginosa</i> utilizada no trabalho
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
ML	Microscopia de luz
ORO	Corante OilRed-O
PAT	Família de enzimas "palmitoil acil transferase"
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
PHV	Polihidroxivalerato
Rab	Família de proteínas GTPases
TAG	Lipídeos neutros como trigliceróis
TIP47	Proteína pertencente à família PAT
VG	Vesículas de gás
VME	Vesículas de membrana externa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CIANOBACTÉRIAS	15
1.1.1 Aspectos Gerais	15
1.1.2 Ultraestrutura	18
1.1.3 Principais diferenças entre Cianobactérias, demais Bactérias e Células Eucarióticas	21
1.1.4 Importância Ecológica	23
1.1.5 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	24
1.1.6 <i>Microcystis aeruginosa</i>	26
1.1.7 Interações entre Cianobactérias	26
1.1.8 Alelopatia entre <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> x <i>Microcystis aeruginosa</i> : o caso do Reservatório do Funil	30
1.2 CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	32
1.2.1 Aspectos Gerais	32
1.2.2 Estrutura e Composição	33
1.2.3 Corpúsculos Lipídicos em Cianobactérias	36
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 CULTURA ESTOQUE	38

3.2 EXPERIMENTO DE INTERAÇÃO	38
3.3 ANÁLISE DE DENSIDADE CELULAR	39
3.4 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA	39
3.5 ANÁLISE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS POR MICROSCOPIA DE LUZ	40
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRASMISSÃO (MET)	41
3.7 CAPTURA E ANÁLISE DE IMAGENS	42
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
4 RESULTADOS	44
4.1 DENSIDADE	44
4.2 VIABILIDADE CELULAR	45
4.3 ANÁLISES DE CLS POR MICROSCOPIA DE LUZ	47
4.4 ULTRAESTRUTURA	49
4.4.1 Características Gerais	49
4.4.2 Corpúsculos Lipídicos	50
4.4.3 Vesículas de Membrana Externa em <i>C. raciborskii</i>	50
4.4.4 Grânulos de Polifosfato	51
4.4.5 Área de Tilacoides	51

5 DISCUSSÃO	59
5.1 DENSIDADE x VIABILIDADE CELULAR	59
5.2 CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	62
5.3 ULTRAESTRUTURA GERAL DE CIANOBACTÉRIAS	65
5.3.1 Vesículas de membrana externa em <i>C. raciborskii</i>	66
5.3.2 Grânulos de Polifosfato	68
5.3.3 Área de Tilacoides	69
6 CONCLUSÕES	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO: Artigo “The Intriguing Ultrastructure of Lipid Body Organelles Within Activated Macrophages”	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 CIANOBACTÉRIAS

1.1.1 Aspectos Gerais

As cianobactérias são um dos microrganismos mais antigos do Planeta. Surgiram há cerca de 3,5 bilhões de anos, sendo os primeiros produtores primários a liberarem oxigênio na atmosfera. São considerados os primeiros fotossintetizantes que apresentam clorofila a e realizam fotossíntese através dos fotossistemas I e II (MUR; SKULBERG; UTKILEN, 1999). A produção de compostos orgânicos e a alta eficiência no uso do oxigênio para obtenção de energia, permitiram a esses organismos o aumento da capacidade de carga biológica e, ao mesmo tempo, o surgimento de uma elevada diversidade de espécies capazes de se adaptar à diferentes condições ambientais (TSUKAMOTO et al., 1993). As cianobactérias apresentam ampla distribuição ocupando os mais diversos habitats, aquáticos e terrestres.

Por muitos anos, as cianobactérias foram classificadas como algas verdes-azuladas ou Cyanophyta juntamente com as algas eucarióticas no Código de Nomenclatura Botânica (GUPTA et al., 2013; LEE, 2008). Porém as cianobactérias são microrganismos procaríotos e atualmente são classificados junto com as bactérias no Domínio Bactéria (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990).

A diversidade morfológica do grupo é grande e pode se apresentar em formas unicelulares ou coloniais. Nas colônias, o arranjo das células pode ser irregular, radial ou em planos ordenados. O diâmetro celular varia de 0,5 μm à 100 μm (DUFRESNE et al., 2003). A morfologia das cianobactérias é bastante diversificada (Fig. 1). Os indivíduos unicelulares podem ter formas arredondadas, oblongas, elípticas, cilíndrico-arredondadas, fusiformes e piriformes. As células apresentam ou não envoltório mucilaginoso, dependendo da espécie (SANT'ANNA et al., 2006).

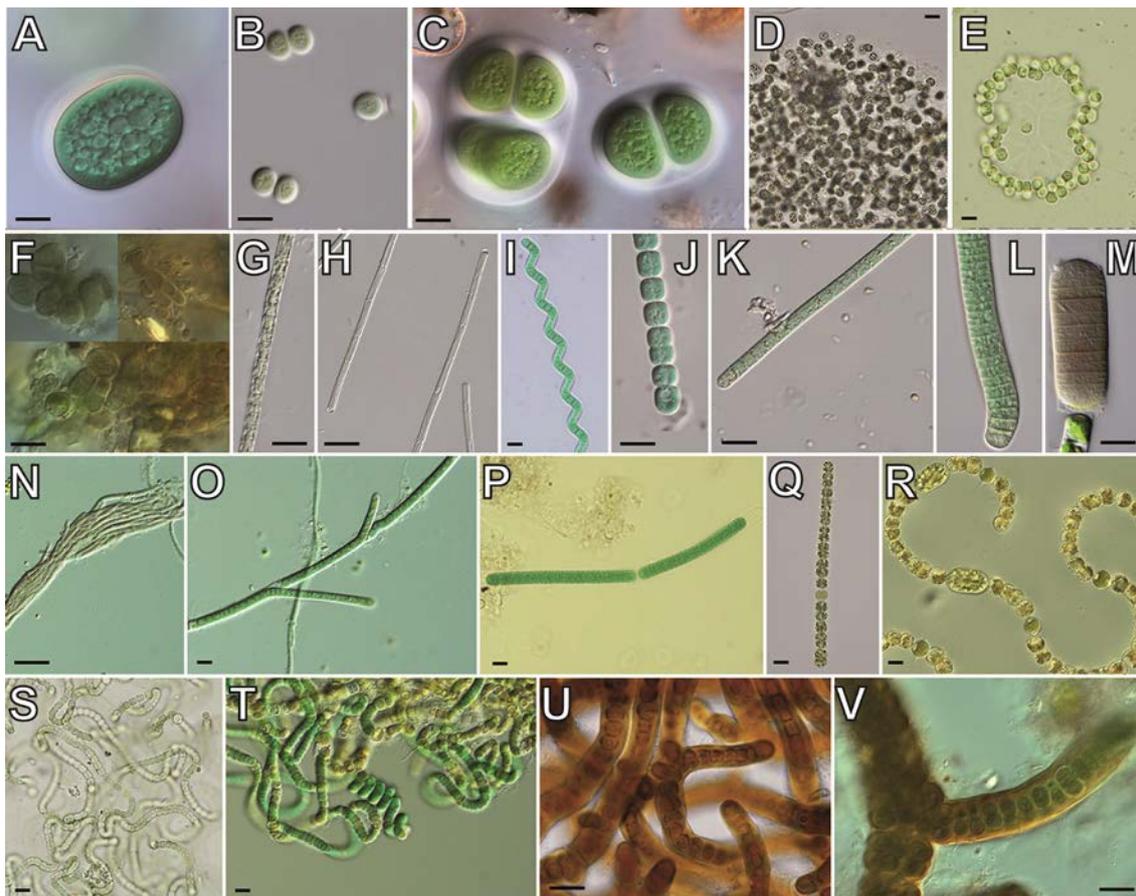


Figura 1: Diferentes tipos de morfologia encontrados no grupo das cianobactérias. Em (A), observe cianobactéria unicelular, e em (B-V), cianobactérias coloniais. As colônias podem conter duas (B) ou mais células (C-V), que se arranjam em forma de grumos (D-F) ou filamentos (G-V). Barra= 10 μm (A-U), 20 μm (V). Imagem adaptada de DVOŘÁK et al. (2015).

Em algumas espécies, os indivíduos unicelulares (Fig. 1A) podem se reunir formando colônias (Fig. 1B-V). As cianobactérias coloniais podem ser formadas por poucas células (2 a 16) ou centenas delas; apresentando diferentes morfologias (Fig. 1B-V). As cianobactérias filamentosas, podem formar um tricoma, quando as células se dispõem linearmente (Fig. 1G-V). Assim, o filamento é formado pelo conjunto de bainha mucilaginosa e o tricoma (SANT'ANNA et al., 2006).

Os tricomas podem apresentar apenas células vegetativas ou células modificadas (heterocisto e acineto), que possuem extrema importância fisiológica e ecológica. Os heterocistos são células de parede fina e protoplasma hialino, especializadas na fixação de nitrogênio. Os acinetos são células grandes, igualmente de parede fina, com capacidade de reserva que permite a sobrevivência da espécie sob condições desfavoráveis (SANT'ANNA et al., 2006).

1.1.2 Ultraestrutura

Dados sobre a ultraestrutura de cianobactérias ainda são escassos na literatura (GANTT; CONTI, 1969; LIBERTON et al., 2006; VALDOR; ABOAL, 2007).

As cianobactérias são delimitadas por um envoltório celular e podem apresentar diversas estruturas citoplasmáticas, conforme representado na figura 2.

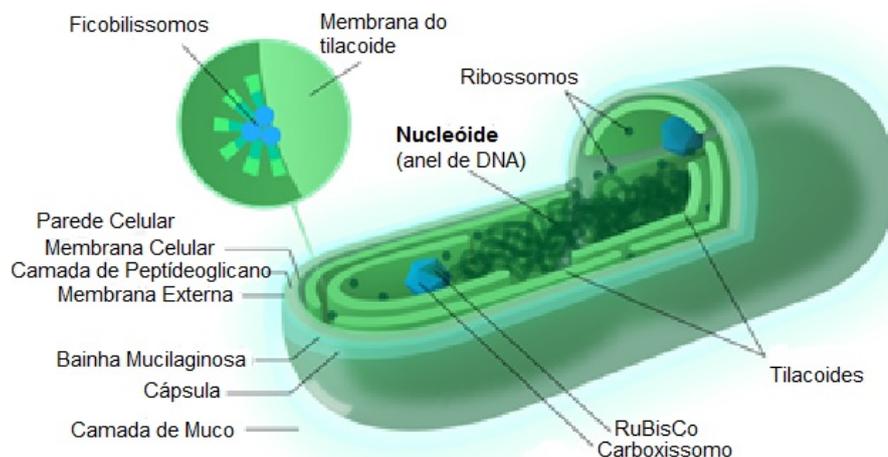


Figura 2: Esquema tridimensional evidenciando o envoltório celular típico de uma cianobactéria. Observe as estruturas típicas de cianobactéria como, nucleóide, ribossomos, membrana de tilacoides e ficobilissomos. Note que o envoltório celular é composto por membrana plasmática, parede celular com camada de peptídeoglicano e membrana externa, e pode apresentar ainda bainha mucilaginosa, cápsula e camada de muco.

O envoltório celular das cianobactérias é típico de bactérias Gram-negativas, apresentado três camadas distintas: membrana plasmática, parede celular e membrana externa (Fig. 2). Seu envoltório, porém, é consideravelmente mais espesso que o das demais bactérias gram-negativas. Exibe grande variação de acordo com a espécie e pode atingir até 700 nm de espessura (HOICZYK; HANSEL, 2000).

Algumas cianobactérias secretam polissacarídeos extracelulares que podem formar uma mucilagem ou uma bainha fibrilar externamente à parede celular (HOICZYK; HANSEL, 2000). Além disso, tais camadas podem em conjunto com a parede celular conectar fortemente as células em um filamento (Fig. 3).

Dentre as estruturas citoplasmáticas, as membranas de tilacoides são na maioria das cianobactérias, as estruturas mais abundantes no citoplasma. Os tilacoides são projeções intracitoplasmáticas da membrana plasmática, que formam variados arranjos no interior das células. As membranas de tilacoides podem se arranjar concentricamente seguindo o formato celular ou apresentarem-se dispersos em formas variadas de acordo com a espécie (FLORES; HERRERO, 2008). Nos tilacoides localizam-se o aparato fotossintético (fotossistemas I e II) e aderidos a eles podem-se encontrar estruturas concêntricas, chamadas ficobilissomos. Os ficobilissomos (Fig. 3, cabeça de seta) são formados por pigmentos acessórios (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina) que funcionam como complexos de antenas na captação da luz e transferência de energia para a reação de fotossíntese. Os pigmentos fotossintéticos, como a clorofila a e os demais componentes celulares estão dispersos no citoplasma.

Diversas estruturas internas podem ser encontradas nas cianobactérias, dentre elas as principais são os ribossomos 70S típico de células procarióticas, os corpos poliédricos, ou carboxissomos (Fig.3, CP) que participam da fixação de carbono atmosférico, os aerótopos, ou vesículas de gás (Fig.3, VG) com função a flutuação no meio aquático, e uma variedade de grânulos com diversas funções, como por exemplo, os grânulos de fosfato (Fig. 3, GP) onde ocorre o armazenamento de fósforo na forma de grãos de polifosfatos no

citoplasma. Há também a presença de corpúsculos lipídicos, que serão descritos com mais detalhes mais adiante.

Trabalhos com a descrição da ultraestrutura de diferentes gêneros de cianobactérias, por exemplo, *Anabaena*, *Mycrocistis*, *Oscillatoria* e *Synechococcus*, mostram uma grande variedade na distribuição das estruturas na célula e a influência do ambiente e da condição de crescimento sobre a presença e dispersão das mesmas (ALLEN, 1984; CASAMATTA et al., 2005; FALCON et al., 2004; FREDRIKSSON; BERGMAN, 1997; GROMOV; GAVRILOVA; KONOVALOV, 1986; JENSEN, 1993; PALIŃSKA; KRUMBEIN; SCHLEMMINGER, 1998). Por exemplo, NOYMA (2009) investigou, pela primeira vez, a ultraestrutura da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* e mostrou um envoltório celular trilaminar típico e um citoplasma contendo um sistema de membranas intrincado (tilacoides) com ficobilissomos associados e outras estruturas, tais como grânulos de polifosfato e carboxissomos (Fig. 3). Além disso, este estudo revelou que a ultraestrutura, principalmente as estruturas relacionadas ao aparato fotossintético, podem ser alteradas pela exposição a radiação ultravioleta (UV).

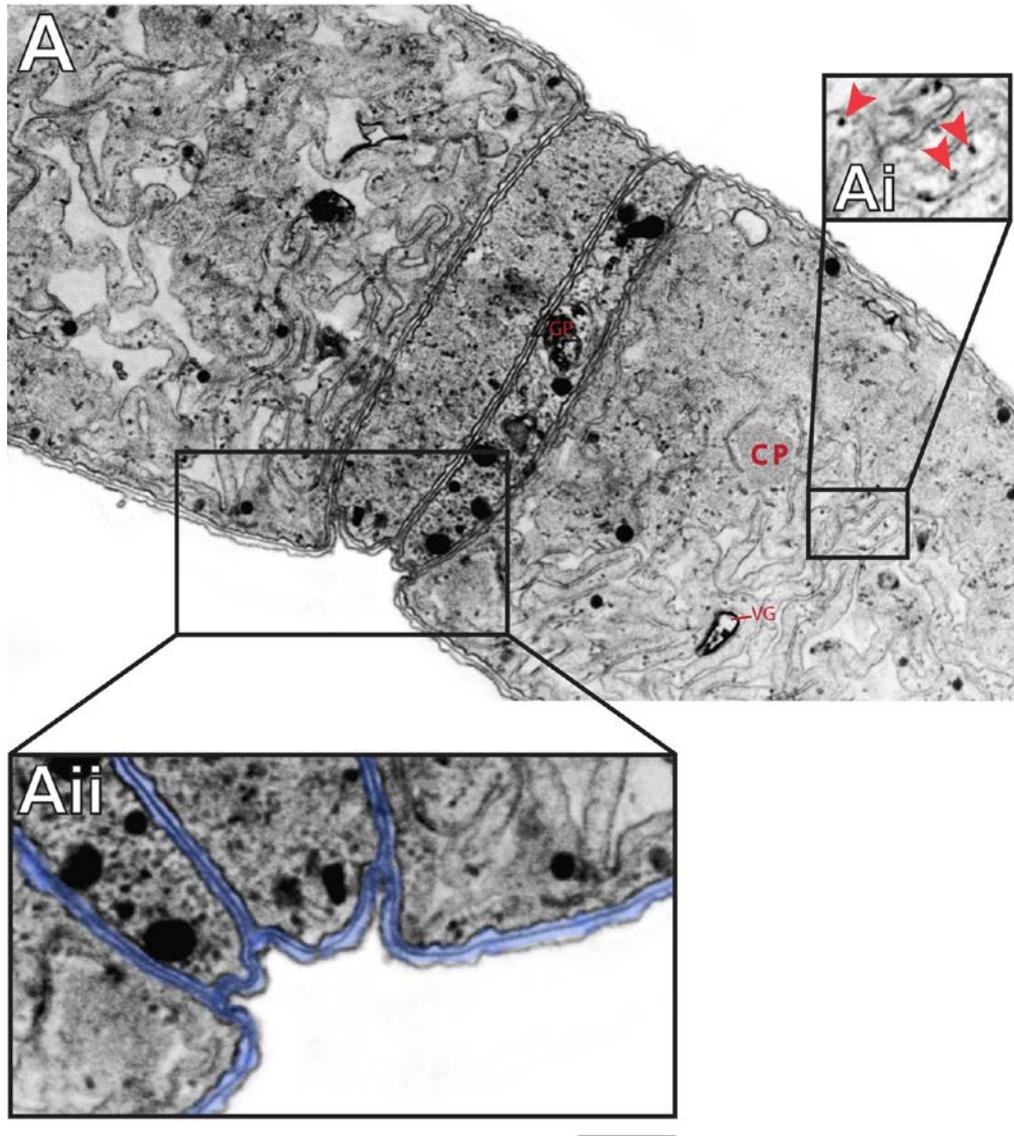


Figura 3: Fotomicrografia eletrônica mostrando as principais estruturas encontradas em cianobactérias. Em (A), é possível visualizar a estrutura geral de duas células de *Cylindrospermopsis raciborskii*, a qual possui grânulos de polifosfato (GP), corpos poliédricos (CP) e vesículas de gás (VG). Em (Ai) os ficobilissomos são evidenciados (cabeças de setas vermelhas) associados às membranas dos tilacoides. Por último, em (Aii) o envoltório da cianobactéria se mostra colorido em azul, evidenciando a parede celular. Barra = 1 μ m. Retirado de (NOYMA, 2009).

1.1.3 Principais Diferenças entre Cianobactérias, demais Bactérias e Células Eucarióticas

As cianobactérias se diferenciam das células eucarióticas e apresentam estrutura celular procariótica como à das bactérias, porém apresentam algumas características específicas, conforme mostrado no quadro 1.

Quadro 1: Diferenças entre célula procariótica e célula eucariótica, diferenciando as cianobactérias dos demais grupos do Domínio Bactéria.

	CÉLULA PROCARIÓTICA		CÉLULA EUCARIÓTICA
DOMÍNIO	BACTERIA		EUCARIA
	Cianobactéria	Demais Bactérias	
Envoltório Nuclear	Ausente	Exceto em um grupo (Planctomicetos)	Presente
Nucléolo	Ausente	Ausente	Presente
DNA	Molécula única, sem histonas e com plasmídeos	Molécula única, sem histonas e com plasmídeos	Presente em vários cromossomos, e com histonas
Divisão Celular	Mitose, ausência de aparelho mitótico	Mitose, ausência de aparelho mitótico	Mitose ou meiose, presença de aparelho mitótico com fuso cromático microtubular
Membrana	Sem esteróis	Algumas possuem esteróis	Geralmente com esteróis presentes
Endomembranas	Estruturas membranosas, como tilacóides e organelas de reserva	Restritas a alguns grupos	Organelas típicas

Estrutura fossintetizante	Tilacoides (projeções membranares), Com Fotossistema I e II e clorofila a	Tilacoides (projeções membranares), fotossistema II e bacteriofila	Cloroplasto (Somente em plantas e algas)
Cadeia respiratória	Na membrana plasmática	Na membrana plasmática	Na membrana mitocondrial
Ribossomos	70S	70s	80S, exceto para ribossomos, mitocôndrias e cloroplastos
Envoltório celular	Gram-Negativo: membrana plasmática, parede celular de peptídeosglicanos e membrana externa	Gram-negativo ou Gram positivo (sem membrana externa)	Membrana plasmática. Com parede celular presente somente em plantas, algas e fungos
Flagelos	Não possuem flagelos	Flagelos de dimensões sub-microscópicas, cada um composto de uma fibra de dimensão molecular; rotação	Flagelos ou cílios; dimensões microscópicas; compostos de microtúbulos; sem rotação
Microtúbulos	Ausentes Obs.: os demais elementos do citoesqueleto são "homólogos" aos encontrados em células eucarióticas	Ausentes Obs.: os demais elementos do citoesqueleto são "homólogos" aos encontrados em células eucarióticas	Presentes em flagelos, cílios, corpos basais, fuso mitótico, centríolos e citoplasma

1.1.4 Importância Ecológica

As cianobactérias possuem grande importância ecológica, uma vez que são as principais responsáveis pela produção primária em ecossistemas aquáticos. Sobretudo nas águas pobres em nutrientes de grande parte dos oceanos e de alguns grandes lagos, as cianobactérias contribuem com porção expressiva da assimilação fotossintética do carbono (WHITTON; POTTS, 2012). Dentre suas principais importâncias ecológicas estão as interações tróficas (ADAMS; DUGGAN; JACKSON, 2012) e relevante contribuição para o ciclo de nutrientes (CAPONE, D.; CARPENTER, 1999). São componentes base da rede trófica, sendo ativamente consumidas e metabolizadas por consumidores primários (ADAMS et al., 2012). Nos oceanos, representam ainda parcela significativa dos organismos diazotróficos (fixam nitrogênio) e desempenham importante papel na síntese de nitrogênio orgânico (CAPONE, D. G., 2001).

As cianobactérias apresentam uma ampla tolerância ecológica que contribui para o seu sucesso competitivo, tendo como uma das características marcantes a capacidade de crescimento nos mais variados ambientes (WHITTON; POTTS, 2012).

Nas últimas décadas, os problemas decorrentes da eutrofização dos corpos aquáticos têm se acentuado. A eutrofização é o processo de perda de qualidade da água, ocasionada pelo envelhecimento natural do ecossistema, que passam de uma condição oligotrófica (concentração baixa de nutrientes) para uma condição eutrófica (elevada concentração de nutriente) ou por ação antrópica com o despejo de resíduos líquidos e sólidos. Neste contexto, as cianobactérias desempenham papel decisivo, uma vez que, em ambientes eutrofizados e hipertrofizados, sobretudo de água doce, representam os organismos dominantes. É muito frequente o registro da dominância desse grupo em reservatórios e lagoas costeiras brasileiras formando florações frequentes (HUSZAR; SILVA, 1999).

As florações são definidas como fenômeno ocasionado pela proliferação demasiada, dominada por única ou poucas espécies de cianobactérias, que resulta em coloração visível, de forma diferenciada nos

sistemas naturais, produzindo gosto e odor desagradáveis, alterando o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos. Além dos desequilíbrios ecológicos relacionados à perda da diversidade e alterações ao longo da cadeia trófica, as florações de alguns grupos de cianobactérias resultam em problemas como aumento de turbidez e diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (CARMICHAEL, 2001). Tais alterações levam a uma diminuição da qualidade da água, bem como problemas associados à saúde humana, já que alguns grupos de cianobactérias produzem metabólitos secundários tóxicos (cianotoxinas) (FUNARI; TESTAI, 2008; ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Dentre os gêneros mais frequentes relacionadas a florações no Brasil, destacam-se *Microcystis*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis*. Florações tóxicas destes gêneros já foram registradas em vários ecossistemas aquáticos brasileiros (BOUVY et al., 2000; MAGALHAES; AZEVEDO, 1998).

1.1.5 *Cylindrospermopsis raciborskii*

Cylindrospermopsis raciborskii Seenayya et SubbaRaju (1972) é uma cianobactéria filamentosa pertencente à ordem Nostocales. Tem como característica a formação de tricomas solitários retos ou ligeiramente curvados, com vesículas de gás e heterocisto terminal em uma ou nas duas extremidades do filamento, células vegetativas cilíndricas e acinetos oblongos-ovais (EVERSON et al., 2011; SHAFIK et al., 2003). Embora tenha sido descrita como uma espécie tropical/subtropical, sua ocorrência em ambientes de regiões temperadas tem crescido na última década (EVERSON et al., 2011; HAMILTON et al., 2005; PADISÁK, 1997; SINHA, RATI et al., 2012). A expansão geográfica de ocorrência de *C. raciborskii* é parcialmente atribuída a combinação de adaptações fisiológicas com a habilidade de sobrevivência em condições desfavoráveis. Tais fatores incluem a formação de acinetos e a tolerância a baixa disponibilidade de fósforo e nitrogênio. *C. raciborskii* é caracterizada como uma espécie com alta tolerância ao sombreamento, com baixo requerimento de luz, apresentando alta taxa de assimilação de amônio e capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Além disso, essa espécie possui uma alta afinidade por fósforo, sendo capaz de estocar este nutriente, além de

ser resistente a predação pelo zooplâncton (PADISÁK, 1997). Possui ainda a capacidade de regular flutuação através de vesículas de gás denominadas aerótopos, possibilitando ao organismo certo controle sob a sua posição na coluna d'água, permitindo assim que se mova, verticalmente, em direção a uma intensidade luminosa favorável e disponibilidade de nutrientes. Contudo, o aumento da temperatura global e eutrofização também têm sido considerados para explicar sua ampla distribuição (SINHA, RATI et al., 2012). *C. raciborskii* ocupou rapidamente uma extensa área geográfica, ocorrendo num amplo número de lagos, reservatórios e rios tropicais (PADISÁK, 1997), produzindo florações, algumas tóxicas, em muitos corpos d'água ao redor do mundo (BRANCO; SENNA, 1994; CHAPMAN; SCHELSKE, 1997; DOKULIL; MAYER, 1996).

C. raciborskii é caracterizada como uma espécie com alta tolerância ao sombreamento, com baixo requerimento de luz, apresentando alta taxa de assimilação de amônio e capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Além disso, essa espécie possui uma alta afinidade por fósforo, sendo capaz de estocar este nutriente, além de ser resistente a predação pelo zooplâncton (PADISÁK, 1997).

Possui ainda a capacidade de regular flutuação através de vesículas de gás denominadas aerótopos, possibilitando ao organismo certo controle sob a sua posição na coluna d'água, permitindo assim que se mova, verticalmente, em direção a uma intensidade luminosa favorável e disponibilidade de nutrientes.

Além da recente dispersão geográfica desta cianobactéria, a *C. raciborskii* vem se tornando uma das espécies de cianobactérias de maior interesse de pesquisadores, pois são capazes de formar florações e produzir toxinas. Dentre as toxinas produzidas por esta espécie encontram-se diversas hepatoxinas e neurotoxinas (CARNEIRO; PACHECO; DE OLIVEIRA E AZEVEDO, 2013). Já foram documentadas florações, algumas tóxicas, em muitos corpos d'água ao redor do mundo (BRANCO; SENNA, 1994; CHAPMAN; SCHELSKE, 1997; DOKULIL; MAYER, 1996; SINHA, R. et al., 2012).

1.1.6 *Microcystis aeruginosa*

Microcystis aeruginosa é uma das espécies mais estudadas, pois tem ocorrência cosmopolita e representa impacto negativo em vários ecossistemas aquáticos do mundo por ser potencialmente produtora da cianotoxina microcistina (VISSER et al., 2005). *Microcystis* é um gênero de cianobactéria formador de colônia, ou seja, várias células que ocorrem agrupadas, envolvidas pela bainha de mucilagem. O tamanho da colônia varia de poucas a centenas de células que são esféricas, possuem membrana tilacoidal, membrana citoplasmática, parede celular com uma nítida camada de peptidoglicano, membrana externa e uma camada de glicálise. O citoplasma contém corpos de polifosfato, grânulos de cianoficina, inúmeras vesículas de gás (CAIOLA; PELLEGRINI, 1984), além dos corpúsculos lipídicos. Esse gênero foi descrito por Kützing no início do século XX (KÜTZING, 1843). Em ambientes eutrofizados, o gênero *Microcystis* é capaz de formar florações com potencial para produção de microcistinas – peptídeos extremamente tóxicos – configurando um gênero de enorme impacto econômico e social devido aos problemas gerados à saúde humana (MEISSNER; STEINHAUSER; DITTMANN, 2014).

1.1.7 Interações Entre Cianobactérias

Nos ecossistemas aquáticos as interações entre cianobactérias são bastante comuns. Diversas populações podem dividir um mesmo ambiente e inclusive competirem por nichos específicos. Os poucos trabalhos que estudam as interações entre cianobactérias sugerem que a competição se dá principalmente por meio de interação bioquímica, chamada alelopatia. Na definição de MOLISCH (1937), apud LEGRAND et al. (2003), utilizada por muitos trabalhos que abordam a alelopatia em comunidades fitoplanctônicas, esta interação é definida como “todo tipo de interação bioquímica entre plantas superiores e entre plantas superiores e micro-organismos (LEGRAND et al., 2003; MOLISCH, 1937). Deve ser considerado que os princípios gerais da alelopatia não diferem de forma drástica entre os diferentes ambientes aquáticos, respeitando suas particularidades (GROSS, 2003).

Portanto, a existência do emissor de um composto químico, capaz de afetar um organismo receptor é premissa básica para seu estabelecimento. Além disso, esse tipo de interação interespecífica é capaz de conferir vantagens competitivas para um dos indivíduos envolvidos e, nesse sentido, existem divergências entre os autores. Enquanto alguns consideram apenas os efeitos negativos à reprodução do receptor, outros incluem os efeitos positivos ao mesmo, na conta da alelopatia (FISTAROL et al., 2004; LEGRAND et al., 2003). Provavelmente essa divergência é consequência de interpretações evolutivas distintas para o estabelecimento da interação, ou até mesmo da ausência desse tipo de reflexão. Espera-se que um efeito inibitório do aleloquímico sobre o receptor seja característica adaptativa do organismo emissor, enquanto o contrário seja capaz de conferir seleção vantajosa ao próprio receptor.

A concepção que considera como alelopatia apenas como as interações químicas causadoras de efeitos negativos para o receptor já rendeu a descrição de possíveis cenários evolutivos para seu estabelecimento. De acordo com esta visão, um cenário provável se configura a partir do momento em que compostos tóxicos são excretados inicialmente com o objetivo de evitar autotoxicidade, ou quando mecanismos de resistência a compostos tóxicos previamente excretados são desenvolvidos pelo produtor. Isso levaria a uma vantagem secundária para a célula produtora na medida em que o composto tóxico passasse a afetar seus competidores, mas não a própria célula produtora (LEFLAIVE; TEN-HAGE, 2007). De acordo com o modelo de SINKKONEN (2006), esse processo, inicialmente não direcionado à competição, pode vir a se tornar “intencional paralelo” (aleloquímico com múltiplas funções) ou “primário” (aleloquímico com função exclusiva), caso aumente o valor adaptativo do emissor por tempo o suficiente. Por outro lado, não foi encontrado nenhum trabalho que desenvolvesse de modo semelhante um quadro teórico compatível com o estabelecimento das chamadas interações alelopáticas positivas. No entanto, a utilização ambígua do conceito não é contestada por KEATING (1977), após verificar que o efeito de “filtrados celulares” de cepas de diversas espécies fitoplanctônicas, isoladas do lago Linsley, Connecticut, era positivo ou neutro sobre espécies sucessoras na

dinâmica da comunidade do lago e negativo sobre suas antecessoras. MOHAMED (2002) também afirma que “a atividade alelopática de *Spirogyra* sp. estimula o crescimento e a produção de toxina por *Oscillatoria agardhii* e deve ser levada em consideração durante monitoramentos de florações de cianobactérias”.

De modo diferenciado, LEWIS JR (1986) sugere o conceito de “alelopatia sinal”, explicando efeitos inibitórios como possível característica do receptor, que se utilizaria do sinal químico como uma maneira de “tatear” o nicho e estabelecer duas estratégias possíveis: 1) crescimento ou 2) reserva e manutenção. Com isso, o autor afirma ter encontrado uma possível solução para se contornar críticas frequentes, que afirmam não ser a alelopatia uma interação ecológica, evolutivamente estável, devido às questões de benefício distribuído e de incompetência adaptativa. Para as interações alelopáticas ditas positivas, esses argumentos não parecem ser um problema, tampouco o conceito de “alelopatia sinal” parece ser contraditório para as mesmas (LEWIS JR, 1986).

É importante perceber que as perspectivas apresentadas não são excludentes entre si. Apesar disso, fica evidente o risco de, na falta de contextualização evolutiva, estar se agrupando características adaptativas de origens evolutivas e consequências ecológicas bastante distintas. No entanto, poucos trabalhos realizam o exercício teórico necessário, restringindo suas conclusões a uma transposição direta dos resultados laboratoriais para o campo, sejam eles estimulatórios ou inibitórios. O presente trabalho se propõe a considerar todas as possíveis teorias já propostas, excludentes ou não, para interpretação dos resultados e entender por qual das conceituações teóricas de alelopatia eles poderiam ser melhor compreendidos.

LEGRAND et al. (2003), reconhecem a importância de uma interpretação evolutiva em estudos sobre alelopatia. Os autores consideram apenas os efeitos negativos como alelopáticos, já que para eles “a interação evoluiu como uma característica própria do doador, conferindo vantagem seletiva a este ao reduzir a capacidade competitiva do organismo competidor”. O trabalho ainda avança nas exigências impostas aos estudos, transpondo para o fitoplâncton os seis critérios apresentados por WILLIS (1985), como pré-

requisitos obrigatórios à demonstração desse tipo de interação em plantas terrestres. Esses critérios são: 1) Encontrar um padrão consistente de inibição de uma espécie alvo, 2) Identificar um composto tóxico, produzido pela espécie emissora para sua(s) competidora(s), 3) Identificar um processo para emissão desse composto no ambiente, 4) Descrever um mecanismo de transporte ou acúmulo do composto no ambiente, 5) Identificar um mecanismo de absorção do composto pela célula alvo. Além disso, o padrão de inibição não deve ser explicado por nenhum fator físico ou qualquer outro fator biótico (WILLIS, 1985).

A composição durante florações de cianobactérias em ambientes aquáticos pode variar de uma única espécie para várias, ocorrendo de forma simultânea ou havendo sucessão de dominância (VALÉRIO et al., 2008). As variações nas populações de cianobactérias podem ser explicadas, além da alelopatia, pela viabilidade de nutrientes, estratificação térmica sazonal, composição da coluna d'água (REYNOLDS, 1987; SOMMER, 1985). Além disso, tais fatores podem ser reguladores uns dos outros. Os trabalhos que tratam de alelopatia no fitoplâncton ainda são, em sua maioria, direcionados para verificar respostas alelopáticas consistentes, bem como o modo de ação do aleloquímico. No entanto, já são encontrados estudos que descrevem diversas condições que podem modular a alelopatia. LEGRAND et al. (2003) afirmam que tanto a história dos organismos no ambiente, quanto o estado fisiológico das células em questão podem afetar a produção e ação do aleloquímico. Os autores também observam que, sendo a maior parte dos compostos alelopáticos desconhecida, a intensidade do efeito do material excretado complexo (exsudado total), sob diferentes condições de crescimento da cepa produtora ou receptora, costuma ser o indicador utilizado, e não o nível de produção de um aleloquímico específico.

Os fatores que influenciam interações alelopáticas podem ser de natureza abiótica (macronutrientes – nitrogênio e fósforo – e luminosidade, principalmente) ou biótica (a espécie produtora, a espécie alvo, o estado fisiológico da célula). Interessante é o fato de a produção do estímulo químico se dar apenas pela presença da própria célula alvo no sistema.

Apesar da grande importância, o reconhecimento dos fatores que regulam as interações alelopáticas não é suficiente para entender o papel dessas interações no ambiente. A identificação da(s) molécula(s) causadoras do efeito também é essencial para se atingir este objetivo. Os poucos trabalhos que identificaram aleloquímicos apontam para sua natureza química diversa. O isolamento e a descrição da estrutura molecular dos aleloquímicos ainda é pouco frequente, sendo muitos desses compostos conhecidos apenas pelas suas características gerais, como peso molecular, espectro de atividade ou polaridade. Mesmo assim, atividades alelopáticas já foram associadas a ácidos graxos, alcalóides, peptídeos, aldeídos e poliéteres, o que sugere uma natureza química heterogênea (LEGRAND et al., 2003).

1.1.5.1 Alelopatia entre *Cylindrospermopsis raciborskii* x *Microcystis aeruginosa*: “o caso do Reservatório do Funil”

A relação entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* tem sido estudada na literatura, visto que ambas são cianobactérias tóxicas que são capazes de formar florações e são geralmente encontradas em um mesmo ambiente. Um dos ambientes mais estudados que apresentam as duas espécies de cianobactérias no Brasil, é o reservatório do Funil.

O Reservatório do Funil está localizado no município de Resende, Rio de Janeiro e sofre um intenso processo de eutrofização, ao longo das últimas duas décadas (FERRÃO-FILHO et al., 2009). Com isso, é recorrente o estabelecimento de florações de cianobactérias no local, durante os períodos mais quentes e de maior aporte de nutrientes. Soares *et al.* (2009), registrou uma biomassa total ao longo do ano representada em 97% por cianobactérias, sendo que junto com *Anabaena circinalis*, a *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* são as mais dominantes neste ecossistema. Além disso, já foi observada uma alternância de composição e densidade entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*, o que sugere uma possível influência da produção de aleloquímicos no processo. Experimentos em “batch” demonstraram influência negativa na taxa de crescimento e no funcionamento do aparato fotossintético de uma cepa de *Cylindrospermopsis*

raciborskii isolada do reservatório, quando cultivada em meio enriquecido com o filtrado celular da cultura mista composta pelas duas espécies (SOARES et al., 2009).

A dominância de *Cylindrospermopsis raciborskii* ao longo de todo o ano é interrompida por uma breve dominância da *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Chroococcales) no verão. Nesse reservatório, *M. aeruginosa* aparece como células isoladas ou em pequenos grupos celulares durante a maior parte do ano, enquanto *C. raciborskii* é dominante, mas colônias grandes representando 67-90% da população são observadas no verão, quando *M. aeruginosa* forma a floração. Já que os suprimentos de nutrientes são constantes no reservatório do Funil e a interferência do zooplâncton não é significativa, fatores físicos podem explicar o recorrente padrão sazonal na dinâmica das cianobactérias, como o tamanho das colônias, o controle forte da flutuação, que permite a segregação de *C. raciborskii* e sua agregação nas camadas mais superficiais da água (SOARES et al., 2009). Entretanto, interações mediadas quimicamente podem afetar a dinâmica das cianobactérias neste ecossistema (LEGRAND et al., 2003). Metabólitos secundários (aleloquímicos) associados a *C. raciborskii* foram encontrados para inibir muitos competidores, entre eles *M. aeruginosa*, e com isso contribuir para a estabilidade da dominância de *C. raciborskii* em diversos ecossistemas tropicais (FIGUEREDO; GIANI; BIRD, 2007).

A cerca da interação entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, além de efeitos na densidade, já foram verificadas alterações na estrutura celular de ambas cianobactérias. (SOARES et al., 2009) verificou a inibição do aparato fotossintético de uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYRF-01) pelo “filtrado celular” de sua cultura mista com uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (MIRF-01), ambas provenientes do reservatório do Funil. Assim, sugere-se que a inibição observada tenha sido resultado de compostos produzidos sob estresse, causado pela competição entre as duas. Entretanto, estudos sobre a alelopatia em interações entre cianobactérias é escasso (LEGRAND et al., 2003), bem como as alterações ultraestruturais que ocorrem nessas células durante interações interespecíficas.

1.2 CORPUSCULOS LIPÍDICOS

1.2.1 Aspectos Gerais

Os corpúsculos lipídicos (CLs), também conhecidos como gotas lipídicas, inclusões lipídicas, esferossomas, oleossomos ou adipossomas são organelas celulares ricas em lipídio. Estas são organelas evolutivamente conservadas e são encontradas desde procariotos à eucariotos e procariotos unicelulares, como bactérias, leveduras e protozoários até organismos pluricelulares complexos como plantas e mamíferos (SUZUKI et al., 2011; WALTHER; FARESE JR, 2012). Foram considerados inicialmente apenas como depósitos de lipídios inertes com pouca relevância funcional. Porém, com o avanço de técnicas de estudo de biologia celular e molecular, vem sendo considerados como organelas versáteis e multifuncionais envolvidas em diversos mecanismos celulares e processos fisiológicos (MURPHY, 2012). Os CLs atuam como depósitos de lipídios neutros que podem ser mobilizados para a geração de energia por β -oxidação, ou para a síntese de membranas e produção de moléculas essenciais derivadas de lipídios, tais como lipoproteínas, sais biliares ou hormônios (DIGEL; EHEHALT; FÜLLEKRUG, 2010). Além destas, estão implicados em várias outras funções celulares, como armazenamento e degradação de proteínas (WELTE, 2007) e replicação viral (HERKER; OTT, 2011), estando estes processos ligados a várias condições fisiológicas e patológicas.

Estas organelas podem ainda estar envolvidas na inflamação em diversos processos de resposta a doenças infecto-parasitárias. Nas células do sistema imune, tais como eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, os CLs constituem sítios de síntese de mediadores lipídicos eicosanóides sendo formados no citoplasma em resposta a doenças inflamatórias e infecciosas (MELO, R. C. et al., 2011).

1.2.2 Estrutura e Composição

Os corpúsculos lipídicos são organelas esféricas compostas por um núcleo hidrofóbico de lipídios neutros, separado do citosol aquoso por uma monocamada de fosfolipídios de superfície, que fornece uma interface para as interações com moléculas anfipáticas presentes no citoplasma.

Em contraste com a maioria das organelas que são envoltas por uma membrana clássica, constituída por uma bicamada lipídica, os CLs são revestidos por uma hemi-membrana, já que conforme mencionado anteriormente, possuem uma única camada de fosfolipídeos anfipáticos (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007; MELO, R. C. et al., 2011). Por este motivo são facilmente identificados a microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 4), onde se mostram com elétron-densidade variável dependendo da sua constituição. Durante o processamento do material para MET, o tetróxido de ósmio é utilizado na contrastação e irá definir o padrão de elétron-densidade. O tetróxido de ósmio é um metal pesado que possui forte afinidade por fosfolipídios. Desta forma, quando os CLs são ricos em fosfolipídios apresentam-se bastante elétron-densos, enquanto os ricos em lipídeos neutros mostram-se elétron-lucidos. Vale ainda salientar que a elétron-densidade, assim como tamanho e número de corpúsculos lipídicos no interior de uma célula vai depender das condições às quais a célula está submetida e dos estímulos externos que agem sobre a célula influenciando em sua constituição (MELO, R. C. et al., 2011; MELO, R. C.; DVORAK, 2012). O princípio de afinidade pelo tetróxido de ósmio é também utilizado em técnicas para observação de CLs por microscopia de luz convencional, onde estas organelas mostram-se como pontos negros no interior da célula. Corantes hidrofóbicos com afinidade por lipídios neutros também podem ser utilizados para obter imagens de CLs por microscopia de luz (ML). Na coloração com o corante OilRed O (ORO), por exemplo, os CLs podem ser facilmente visualizados em campo claro, em vermelho ou por microscopia de fluorescência, onde aparecem em verde, devido à absorbância do corante (560 nm).

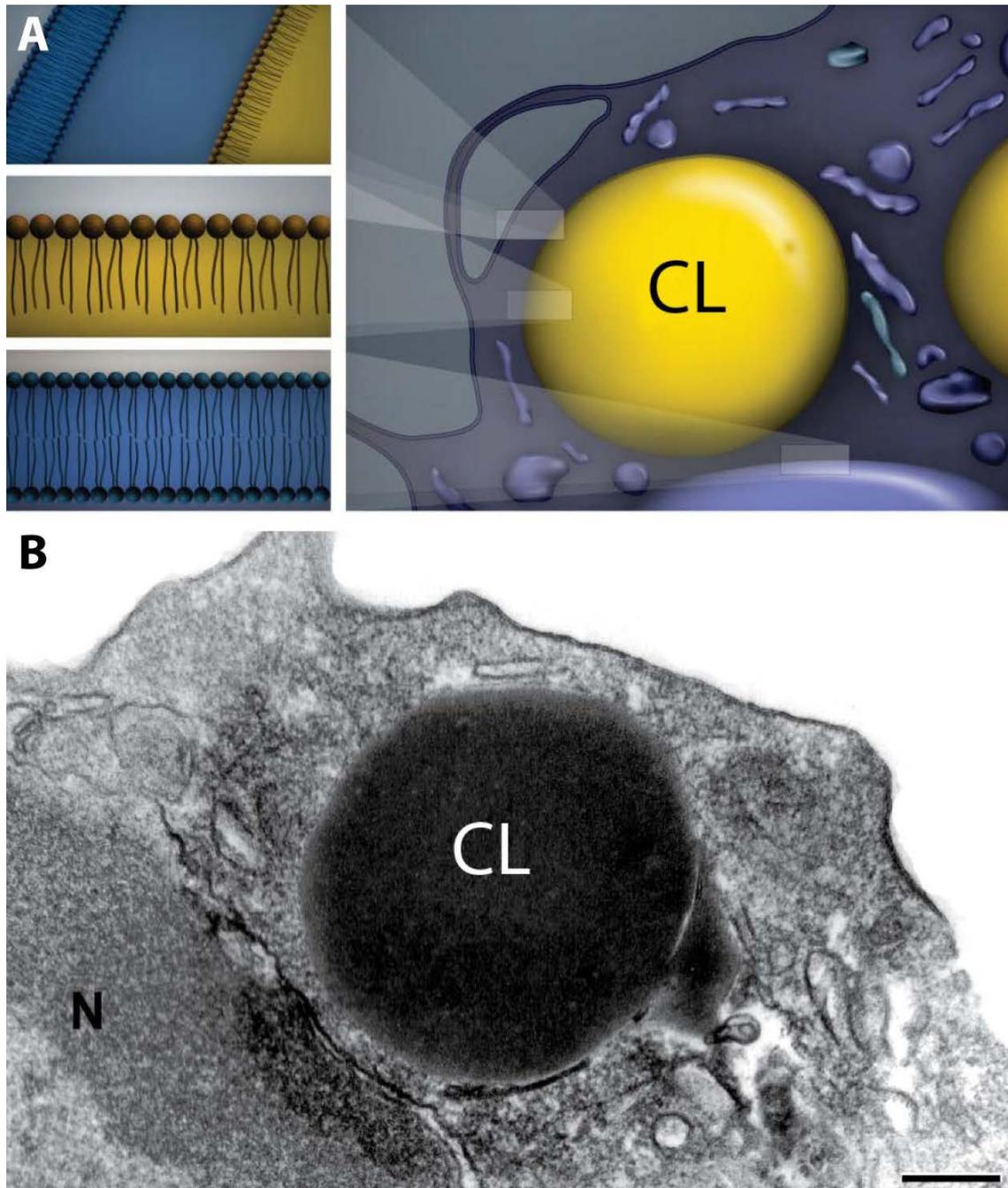


Figura 4 – Aspectos morfológicos de corpúsculos lipídicos (CLs). (A) Desenho esquemático da estrutura de CLs. Estas organelas encontram-se delimitadas apenas por uma monocamada de fosfolipídios. Tal organização estrutural o difere de todas as outras organelas, vesículas citoplasmáticas e membrana plasmática, as quais apresentam uma bicamada lipídica. (B) CL elétron-denso observado no citoplasma de um eosinófilo de sangue humano através de microscopia eletrônica de transmissão. N, núcleo. Barra = 500nm. Adaptada de MELO, R. C. et al. (2011).

A presença de estruturas internas tem sido relatada no núcleo dos CLs, tais como membranas derivadas do RE, que podem ser visualizadas através de microscopia eletrônica e que provavelmente refletem a compartimentalização entre os ésteres lipídicos (WAN et al., 2007). Linhas concêntricas com aparência de casca de cebola observadas em microscopia eletrônica de crio-fratura sugerem a presença de camadas de ésteres do colesterol em CLs de mamíferos (TAUCHI-SATO et al., 2002). As membranas internas e os ribossomos identificados em seus núcleos aumentam ainda mais a complexidade morfológica e funcional destas organelas (DVORAK et al., 1992; MELO, R. et al., 2006; WELLER et al., 1991). Quanto a sua composição, os CLs apresentam uma variedade de moléculas. Basicamente os lipídios neutros presentes no núcleo são ésteres do colesterol e triglicerídeos, cuja quantidade relativa varia entre os tipos celulares (POL; GROSS; PARTON, 2014) e seu entorno é estruturado de fosfolipídios. São encontradas nos corpúsculos lipídicos de células de mamíferos diversos tipos de proteínas como enzimas envolvidas no papel de síntese de lipídios, proteínas envolvidas no acúmulo e metabolismo de ésteres de colesterol, proteínas relacionadas com o tráfego de membrana como as proteínas da família Rab de pequenas GTPases, e proteínas envolvidas na sinalização celular como proteínas-quinases (BRASAEMLE et al., 2004; FUJIMOTO et al., 2008). As primeiras proteínas a serem reconhecidas como constitutivamente associadas aos CLs foram as proteínas da família PAT (perilipina, adipofilina ou ADRP e TIP47), agora renomeadas como proteínas da família perilipina (perilipinas 1-3); estas regulam a formação, o crescimento e a lipólise dos CLs (KIMMEL et al., 2010). Acredita-se que a ADRP (Adipose Differentiation Related Protein) possa estar associada aos estágios iniciais da formação dos corpúsculos lipídicos, agindo como um transportador de ácidos graxos da membrana plasmática ou do citosol para a periferia destas organelas (IMAMURA et al., 2002) e que a perilipina estaria envolvida em processos mais tardios da maturação destas estruturas, onde o seu acesso às lipases na periferia dos corpúsculos leva à mobilização de lipídios neutros para os corpúsculos (BRASAEMLE et al., 2000).

1.2.3 Corpúsculos Lipídicos em Cianobactérias

A maioria dos procariotos são capazes de sintetizar e armazenar uma gama de lipídios poliméricos, dentre os quais os mais comuns são os polihidroxicaloanoatos (PHAs), como polihidroxi butirato (PHB) ou polihidroxi valerato (PHV). Porém algumas bactérias e archeas também podem sintetizar e acumular trigliceróis e estéreis séricos (MURPHY, 2012; WÄLTERMANN; STEINBÜCHEL, 2005). O armazenamento de lipídeos em procariotos, assim como em eucariotos é feito em corpúsculos lipídicos (CLs). Apesar de muitas vezes, estes serem referidos como grânulos ou inclusões citoplasmáticas sua estrutura é idêntica a dos CLs presentes em eucariotos: um centro de lipídeo neutro encerrado por uma membrana única (monocamada lipídica) (MURPHY, 2012).

Em cianobactérias os CLs vêm sendo descritos esporadicamente na literatura, em sua maioria das vezes por análises de microscopia eletrônica (EDWARDS et al., 1968; PERAMUNA; SUMMERS, 2014; VAN DE MEENE et al., 2006; WOLK, 1973). Recentemente também foram observados por ML com utilização de marcadores fluorescentes (PERAMUNA; SUMMERS, 2014). Entretanto, o papel funcional dos CLs em procariotos têm sido atribuído exclusivamente como armazenamento energético, presente normalmente em células vegetativas na interfase (MURPHY, 2012). Porém, Shiet al, 1995, documentou inclusive a presença de cianotoxinas em CLs de cianobactérias, indicando que o papel dos CLs poderia ser muito mais amplo nestes microrganismos (SHI; CARMICHAEL; MILLER, 1995). Outro fator interessante é que parece que os CLs em cianobactérias podem responder a estímulos do meio, como ocorre em eucariotos. Em estudo anterior do grupo de biologia celular e ecologia aquática/UFJF foi observado uma redução de CLs em cianobactérias submetidas à radiação ultravioleta. Hong, 2009 também documentou um aumento de corpúsculos lipídicos em *C. raciborskii*, durante a interação com aleloquímicos de *M. aeruginosa* (HONG et al., 2009). Este fato pode indicar uma resposta direta dos CLs a alterações do meio provocadas durante a competição.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de corpúsculos lipídicos e viabilidade celular na interação entre duas espécies de cianobactérias: *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e quantificar corpúsculos lipídicos em cianobactérias submetidas à interação interespecífica por microscopia de luz de campo claro, utilizando marcação com OilRed-O (ORO);
- Avaliar e quantificar corpúsculos lipídicos em cianobactérias submetidas à interação por microscopia eletrônica;
- Avaliar a viabilidade celular de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* em interação, através de microscopia de fluorescência com uso do marcador *BacLight*;
- Avaliar efeitos na densidade celular das duas espécies, *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, após interação;
- Contribuir com o conhecimento dos corpúsculos lipídicos de cianobactérias, como organelas dinâmicas e seu papel em diferentes situações ambientais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA ESTOQUE

As cianobactérias *C. raciborskii* (CYRF-01) e *M. aeruginosa* (MIRF-01) foram obtidas da coleção de culturas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ. As cepas CYRF-01 e MIRF-01, foram escolhidas para o estudo, pois ambas foram isoladas do mesmo ecossistema (Reservatório do Funil, RJ, Brasil) onde interagem naturalmente (SOARES et al., 2009).

As cepas estoques foram mantidas no Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora, em meio ASM-1 (GORHAM et al., 1964), a 22°C e 310 μmol fóton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, em foto-período de 12:12 horas. O cultivo unialgal não axênico foi mantido em cultura tipo “batch”, no qual os nutrientes vão diminuindo e o número de células aumenta até a capacidade suporte. Neste tipo de cultivo há indivíduos em todos os estágios de crescimento e o estado fisiológico de cada indivíduo não é necessariamente igual (WATANABE et al., 1989).

3.2 EXPERIMENTOS DE INTERAÇÃO

Os experimentos de interação entre cepas de cianobactérias foram realizados de acordo com trabalhos prévios (MELLO et al., 2012). Foram retiradas alíquotas das culturas estoque de CYRF-01 e MIRF-01, ambas com a concentração de 10^6 células mL^{-1} , e colocadas separadamente em erlenmeyrs (40mL) contendo meio de cultura ASM-1. Após incubadas nas mesmas condições do estoque (22° C e 310 μmol fóton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, em foto-período de 12:12 horas) durante 24h, as alíquotas foram então submetidas à interação. Para tal, as alíquotas foram retiradas das culturas diluídas separadas de CYRF-01 e MIRF-01 e colocadas no mesmo recipiente com meio ASM-1 (40mL) e incubadas durante 24 h. Os controles foram estabelecidos a partir das culturas diluídas colocadas em recipientes distintos. Desta forma, foram estabelecidos 5 grupos experimentais:

-Grupo interação: alíquotas de CYRF-01 e MIRF-01 colocadas no mesmo meio durante 24 h.

-Grupo controle CYRF-01 0 h: alíquota de CYRF-01 retirada da cultura e analisada imediatamente.

-Grupo controle MIRF-01 0 h: alíquota de MIRF-01 retirada da cultura e analisada imediatamente.

-Grupo controle CYRF-01 24 h: alíquota de CYRF-01 retirada da cultura e analisada após 24 h no meio de cultura, sem interação, totalmente isolada.

-Grupo controle MIRF-01 24 h: alíquota de MIRF-01 retirada da cultura e analisada após 24 h no meio de cultura, sem interação, totalmente isolada.

3.3 ANÁLISE DA DENSIDADE CELULAR

A densidade de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* foram analisadas após fixação em lugol acético conforme TAVARES; ROCHA (2003). Brevemente, o método consiste na contagem do número de células em câmara de Neubauer sob ML. Foi utilizada objetiva de 40x, em microscópio da marca Olympus, modelo BX 41.

3.4 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA

A integridade das membranas foi investigada através do uso do marcador fluorescente (*BacLight*) como um indicador de viabilidade celular (Boulos et al., 1999). As amostras foram coletadas para cada grupo: controle e interação no início do experimento (0h) e após 24 h. A porcentagem de células vivas/viáveis e mortas/não-viáveis foi determinada utilizando-se do kit de viabilidade celular *Baclight* LIVE/DEAD (Molecular Probes, Inc.), o qual contém uma mistura de corantes fluorescentes (SYTO[®] 9 e iodeto de propídeo), que diferem tanto em suas características espectrais como na capacidade de penetrar as membranas celulares bacterianas saudáveis e permite a diferenciação entre bactérias com membranas celulares intactas e membranas celulares danificadas (BOULOS, LINA et al., 1999; FREESE, H.; KARSTEN, U.; SCHUMANN, R., 2006). O corante SYTO[®] 9 marca células viáveis,

enquanto o iodeto de propídeo marca células não-viáveis (BARBESTI et al., 2000; BERNEY et al., 2007; HOEFEL et al., 2003; JOUX; LEBARON, 2000). Uma mistura contendo volumes iguais dos corantes (volume total de 0,9 μ L) foi adicionada a cada amostra de 30 0μ L e incubadas em local escuro por 20 minutos. Lâminas (SuperFrost™, Fisherbrand™) para cada grupo (n=3), controles e interação, foram preparadas na citocentrífuga (Shandon Cytospin 4, Thermo Electron) como em Silva *et al.* 2013, a 28x g durante 5 minutos em aceleração média (SILVA et al., 2014). Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (BX-60, Olympus) emitindo uma faixa de comprimento de onda de excitação de 450-480nm, que permite a visualização simultânea de células vivas e mortas.

Em cada lâmina foram contadas 100 células de cada cepa e a porcentagem de células viáveis/inviáveis foi obtida (SILVA et al., 2014). A *C. raciborskii* (CIRF-01) forma filamentos que apresentam número variado de células cilíndricas. Portanto, para estabelecimento do número de células contadas de CIRF, os filamentos foram medidos, com auxílio de uma ocular graduada (100x) e o valor encontrado dividido por 8,5 μ m (média de altura das células no filamento).

3.5 ANÁLISE DE CORPUSCULOS LIPÍDICOS POR MICROSCOPIA DE LUZ

Os CLs foram investigados através de marcação com o corante OilRed-O (ORO). O ORO apresenta afinidade por lipídeos neutros e é amplamente utilizado para evidenciar CLs, tanto através de microscopia de luz de campo claro como de fluorescência, em células procarióticas e eucarióticas (CHIARINI-GARCIA; MELO, 2011; KOOPMAN; SCHAART; HESSELINK, 2001). No entanto, considerando que em microscopia de fluorescência o ORO aparece em vermelho no mesmo espectro da clorofila, as análises do presente trabalho foram feitas somente em campo claro, o qual mostra-se igualmente eficaz na observação de CLs.

As amostras (300 μ L) foram coletadas para cada grupo (controle e interação – 0h e 24h) e imediatamente fixadas em paraformaldeído filtrado (poro 0,02 μ m), concentração final de 4%, overnight à 4°C. As lâminas

(SuperFrost™, Fisherbrand™) foram preparadas em citocentrífuga (ShandonCytospin 4, Thermo Electron), 28x g durante 5 minutos em aceleração média (NOYMA, 2009). Previamente à coloração, as lâminas com os citocentrifugados foram cuidadosamente lavadas em filete de água destilada, com auxílio de um pissete, para remoção do excesso de fixador. Após este procedimento, os citocentrifugados foram corados com 3 gotas de ORO (aproximadamente 45µL) diretamente sobre as lâminas, com pipeta Pasteur de bulbo, por 5 min. Logo após, foram colocados 45 µL de isopropanol 30% por 60 segundos sobre os citocentrifugados, os quais foram lavados cuidadosamente com água destilada, para maior distinção dos CLs e remoção do excesso de corante. As lâminas foram montadas em glicerol 70% e observadas em microscópio de luz, em campo claro (BX-51, Olympus). Em cada lâmina foram contadas 100 células de cada cepa. O número médio de CLs por célula foi estabelecido dividindo o número de células pelo número de CLs encontrados. Para o estabelecimento do número de células contadas de *C. raciborskii* os filamentos foram medidos, com auxílio de uma ocular graduada (100x) e o valor encontrado dividido por 8,5 µm (média de altura das células no filamento).

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para os estudos de MET, amostras de células do cultivo submetidas à diferentes tratamentos foram coletadas e processadas de acordo com trabalhos prévios (NOYMA, 2009; SILVA et al., 2014).

As amostras foram imediatamente fixadas, enquanto ainda em suspensão, em solução de Karnovsky (1% paraformaldeído e 1% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4) durante 1 h, lavadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, sob centrifugação (675 x g à 15°C, por 10 minutos) e ressuspendidas no mesmo tampão. As amostras foram, em seguida, incluídas em ágar 2% (marca Cambrex), facilitando o processamento subsequente das amostras o qual é realizado sem contato direto com os organismos. Deste modo, há a diminuição tanto de artefatos causados por danos mecânicos quanto a perda de espécimes durante os demais procedimentos (MELO, R. C.

et al., 2007). Blocos de ágar contendo as amostras foram pós fixados em ósmio reduzido (ferrocianeto de potássio 1,5% em tampão fosfato 0,1 mM e ósmio 1% em água destilada) por 1 h em temperatura ambiente e lavados por três vezes em tampão fosfato 0,1 mM pH 7,3. As amostras foram desidratadas em etapas de concentrações crescentes de álcoois (50% 70%, 90%, 95%), passando em cada etapa duas vezes por 5 min. e por 5 min. em acetona.

As amostras foram pré-infiltradas em meio de inclusão óxido de propileno e araldite em diferentes concentrações (1:1, 1:2, 1:3) e inclusão em resina Araldite. Após polimerização a 60°C por 48 h, foram feitos cortes ultrafinos em ultramicrotomo (Sorvall MT-2B, Dupont, USA), os quais foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (TecnaiSpirit G12, FEI, The Netherlands) em 80 KV, no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, MG).

3.7 CAPTURA E ANÁLISE DE IMAGENS

As imagens de fluorescência foram obtidas usando-se microscópio de fluorescência Olympus BX-60 e câmera digital *Evolution VF* (Media Cybernetics) acoplada ao microscópio juntamente com o programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics).

Para análises ultraestruturais foram estudadas um total de 70 micrografias (CYRF-01 controle = 24 micrografias, CYRF-01 interação = 16 micrografias, MIRF-01 controle = 15 micrografias, MIRF-01 interação = 15 micrografias), em aumentos de 9.300x a 30.000x. Análises morfométricas e quantitativas foram realizadas utilizando o programa de imagem ImageJ (National Institute of Mental Health, USA) e os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Características gerais da ultraestrutura: foram analisadas o tamanho médio das células e a morfologia das principais estruturas de cianobactérias, como vesículas, tilacoides, grânulos de fosfato e carboxissomos;

- CLs: estas organelas foram contadas em secções ultrafinas das células e o número obtido dividido pelo número de células para estabelecimento da média de CLs/célula;

- Grânulos de fosfato: foram quantificados o número destes grânulos por célula;

- Área de tilacoides: foi obtida a porcentagem da área de tilacoides por célula levando-se em conta a área celular total e área citoplasmática ocupada por tilacoides;

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Na análise estatística dos dados obtidos pelas avaliações quantitativas realizadas por ML e MET foi utilizado o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. As análises estáticas e os gráficos foram feitos com a utilização do programa Prism v. 6.01 (GraphPad Software, MD).

4 RESULTADOS

4.1 DENSIDADE

Em primeiro lugar, foi investigado se a interação das duas cepas de cianobactérias levaria às alterações da densidade celular. Análises da densidade das cianobactérias mostraram que não houve alterações significativas quando comparadas as duas cepas (MIRF-01 e CYRF-01) nos grupos controles e grupo interação ao longo do tempo ($F(2, 24) = 0,2109$; $p=0,811$) (Fig. 5). Desta forma, a interação não alterou a densidade celular.

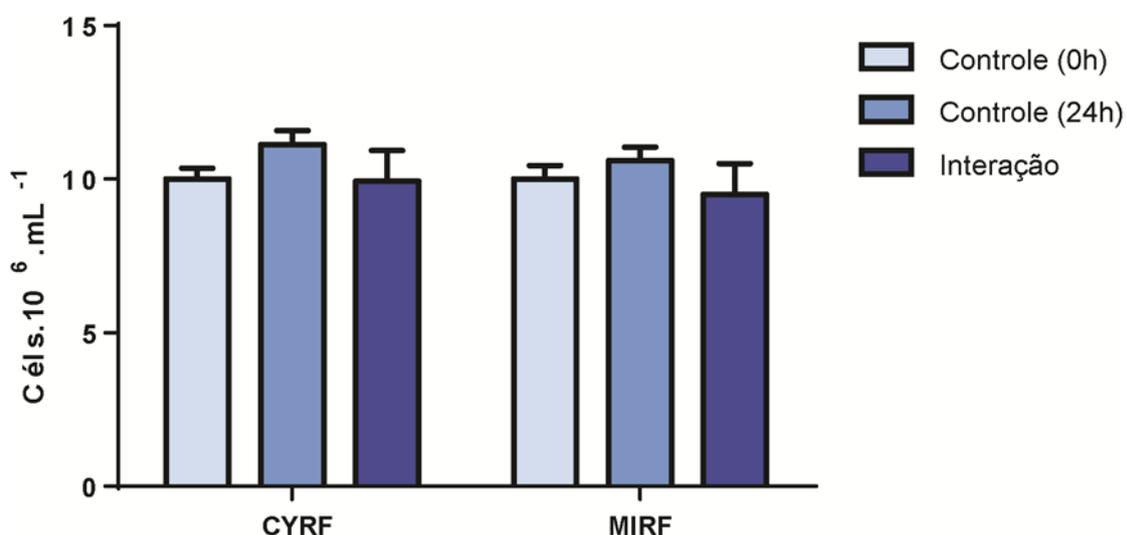


Figura 5 - Densidade celular de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* isoladas e em interação (0h e 24h). As células foram fixadas em lugol acético e contadas em câmara de Neubauer por microscopia de luz de campo claro. Os dados representam a média \pm EP, de contagens realizadas em 3 experimentos independentes.

4.2 VIABILIDADE CELULAR

Posteriormente, avaliou-se a viabilidade de cianobactérias através do uso de marcadores da integridade da membrana plasmática (Fig. 6A e B). Análises quantitativas de cianobactérias viáveis/vivas e não viáveis/mortas foram feitas nas cepas – CYRF-01 e MIRF-01 – isoladas (0h e 24h) e após interação (24h). Análises de variância mostraram que houve diferença significativa entre a porcentagem média de células viáveis/inviáveis quando foram comparadas as duas cepas isoladas nos tempos durante o experimento ($F(5, 48) = 30,22; p < 0,0001$).

A análise de viabilidade demonstrou que tanto CYRF-01 quanto MIRF-01 apresentam maior porcentagem média de células inviáveis na interação quando comparado com os controles em 0h e 24h ($p < 0,05$) (Fig. 6C). Além disso, após interação por 24h, a cepa MIRF-01 apresentou maior porcentagem média de células inviáveis ($10,81 \pm 3,11\%$) que a CYRF-01 ($7,74 \pm 1,47\%$) (Fig. 6C).

Conforme observado em estudos anteriores do Grupo (NOYMA, 2009), notou-se que um mesmo filamento de *C. racirborskii* pode apresentar tanto células viáveis como inviáveis (Fig. 6B), indicando que as células do mesmo filamento não se encontram no mesmo estado fisiológico e podem responder independentemente à estímulos do meio.

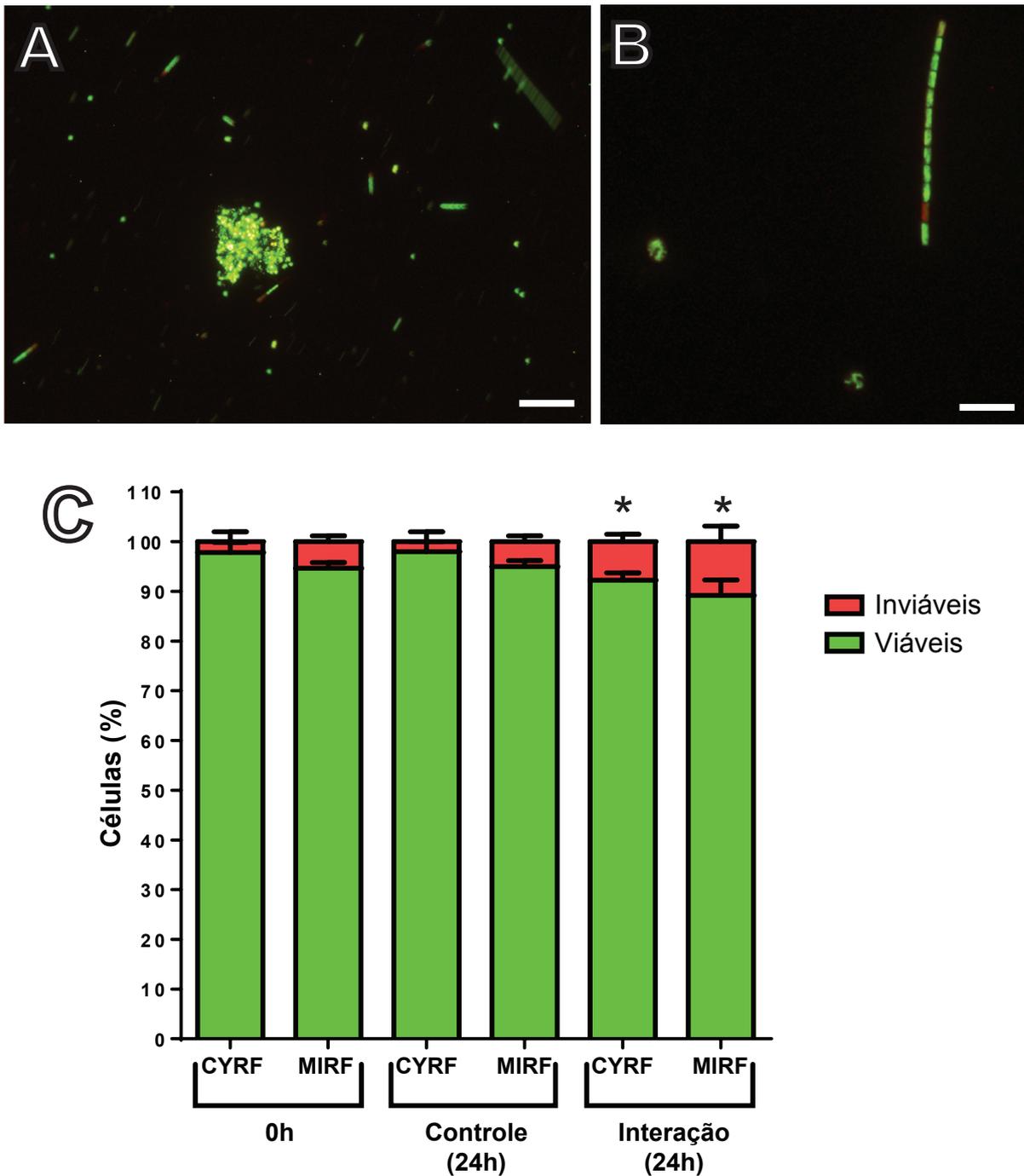


Figura 6 - Viabilidade celular de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*. As cepas de cianobactérias foram submetidas a interação e processadas para microscopia de fluorescência com o marcador *BacLight*. Em (A e B), cianobactérias em interação mostrando células viáveis/vivas (verdes) e inviáveis/mortas (vermelhas). Note em (B) a presença de células viáveis e inviáveis numa mesma colônia (filamento) de *C. raciborskii*. O gráfico (C) mostra a porcentagem média de células vivas e mortas nos controles (0h e 24h) e interação (24h). (*) $p < 0,05$. barras: (A) 40 μm e (B) 20 μm .

4.3 ANÁLISES DE CLs POR MICROSCOPIA DE LUZ

A análise dos CLs nas cianobactérias *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* em interação após 24h e controles com as cepas separadas (0h e 24h) foram feitas com utilização do corante ORO.

A técnica de citocentrifugação para preparação das amostras (SILVA et al., 2014), aliada à utilização do ORO, permitiu boa visualização por microscopia de luz, de CLs nas duas cepas de cianobactérias (CIRF-01 e MIRF-01), tanto nos controles quanto na interação (Fig. 7A, B, C e Ci).

Análises quantitativas na *C. raciborskii* mostraram que entre o controle 0h e 24h, um aumento significativo de CLs (0h = $2,53 \pm 0,07$ CLs/célula e 24h = $8,26 \pm 1,91$ CLs/célula, $p < 0,0001$, Fig. 7D). Após a interação (24h) o número de CLs não foi significativamente diferente do controle em 0h ($p = 0,08$), porém foi menor que o controle em 24h (controle 24h = $8,26 \pm 1,91$ CLs/célula, interação 24h = $3,18 \pm 0,62$ CLs/célula, $p < 0,0001$, Fig. 7D).

Em *M. aeruginosa*, comparando os controles em 0h e 24h, houve uma redução significativa de CLs (0h = $5,27 \pm 0,34$ CLs/célula e 24h = $2,45 \pm 0,43$ CLs/célula, $p < 0,0001$, Fig. 7D). Foi observada também uma redução significativa ($p = 0,001$) na proporção média de CLs do controle em 0h ($5,27 \pm 0,34$ CLs/célula) para interação ($0,32 \pm 0,02$ CLs/célula) e do controle em 24h ($2,45 \pm 0,43$ CLs/célula) para interação ($0,32 \pm 0,02$ CLs/célula) (Fig. 7D).

Em conjunto, os dados mostraram que CLs de cianobactérias são organelas dinâmicas que podem aumentar ou reduzir em número durante o crescimento destas células em culturas isoladas, dependendo da cepa. Além disso, nossos resultados demonstraram que a interação entre as cepas CIRF-01 e MIRF-01, durante 24h de cultivo, leva à redução do número de CLs.

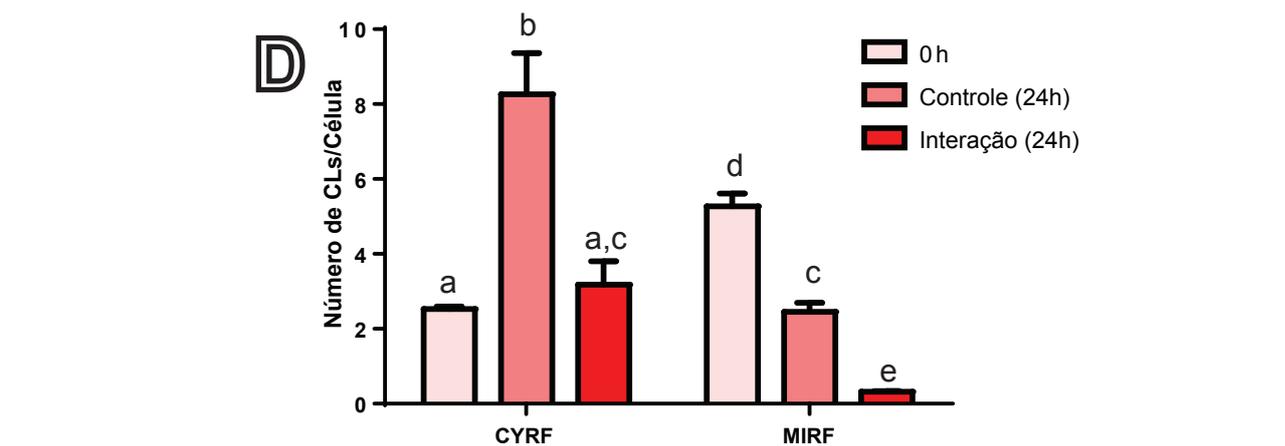
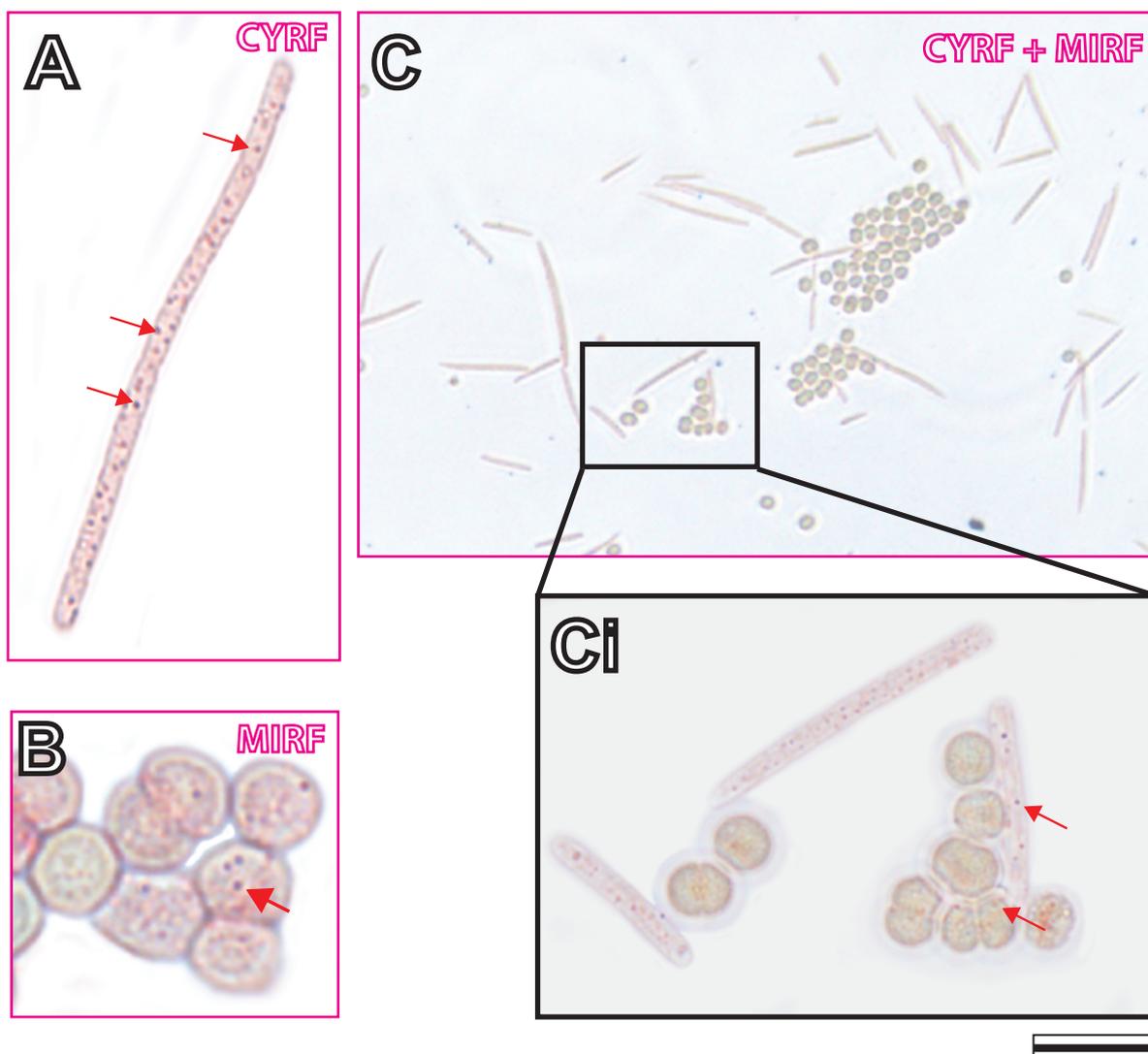


Figura 7 - Corpúsculos Lipídicos (CLs) observados à microscopia de luz em *C. raciborskii* (CYRF) e *M. aeruginosa* (MIRF). Os CLs foram corados com Oil red-O (ORO) nas culturas isoladas de CYRF (A) e MIRF (B) e depois de 24 horas de interação (C e Ci). Note que os CLs apresentam-se como pequenas estruturas arredondadas, coradas em vermelho escuro pelo ORO (setas). Em (D), observe no gráfico, a redução significativa do número de CLs em CYRF quando em interação com MIRF. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$). As amostras ($n=3$) foram preparadas por citocentrifugação e analisadas por microscopia de luz em campo claro. Os dados representam a média \pm EP, tendo sido realizados 3 experimentos. Barra: (A e B) 20 μ m, 100 μ m (C) e (D) 40 μ m.

4.4 ULTRAESTRUTURA

4.4.1 Características Gerais

A ultraestrutura das duas cepas de cianobactérias, quando analisadas isoladamente, mostrou envoltório celular tipicamente gram-negativo, formado por membrana plasmática, periplasma com camada de peptidoglicano e membrana externa (Fig. 8A e B). Em ambas as cianobactérias estudadas, estas camadas integrantes do envoltório celular foram claramente visualizadas. Porém, em *C. raciborskii*, este envoltório mostrou-se nitidamente menos espesso comparado ao de *M. aeruginosa* (compare a Fig. 8Ai com Bi). Além disso, a camada de peptidoglicano no periplasma de *M. aeruginosa* mostrou-se geralmente como uma camada bastante elétron-densa e espessa, diferente do que é observado em *C. raciborskii*, onde o peptidoglicano é visto como uma camada delgada, imersa no periplasma, entre a membrana plasmática e a membrana externa (Fig. 8A e B).

Considerando ambas as cepas nos grupos controles e em interação, foram observadas a presença das seguintes estruturas típicas de cianobactérias, além do envoltório celular gram-negativo (Fig. 8): membranas de tilacoides com ficobilissomos (Fig. 8, seta), vesículas de membrana externa (Fig. 9), carboxissomos (corpos poliédricos) (Fig. 9), vesículas de gás (Fig. 9), camada de exopolímeros extracelulares (Fig.9), grânulos de polifosfato (Fig. 9 e 10) e CLs (Fig. 11).

A área celular de cada cepa de cianobactéria foi analisada. Considerando os planos de corte longitudinais e transversais, a média da área celular de *M. aeruginosa* foi maior ($8,62 \pm 2,01 \mu\text{m}^2$) em comparação com a área de *C. raciborskii* ($5,07 \pm 3,30 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). No entanto, não foram observadas alterações nas áreas celulares quando as duas cepas foram cultivadas em conjunto ($p > 0,05$).

4.4.2 Corpúsculos Lipídicos

Os CLs foram observados ultraestruturalmente como organelas elétrondensas arredondadas no citoplasma de ambas as cianobactérias, *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, tanto nos controles quanto no grupo em interação (Fig. 11).

Análises morfométricas mostraram que o número de CLs por secção celular, no geral, variou de 1 a 13 em MIRF-01 e 1 a 9 em CYRF-01. Além disso, em ambas as cepas após 24 horas de interação houve uma redução significativa ($p < 0,001$) no número de CLs por secção celular (CYRF-01 = $0,77 \pm 0,30$ CLs/secção, MIRF-01 = $3,08 \pm 0,43$ CLs/secção) em comparação com os controles (CYRF-01 = $2,88 \pm 0,07$ CLs/secção, MIRF-01 = $3,78 \pm 0,33$ CLs/secção, Fig. 12A).

Interessantemente, em ambas as cepas, a área média dos CLs nas células do grupo controle (CYRF-01 = $6,02 \pm 3,98$ nm², MIRF-01 = $9,5 \pm 5,65$ nm²) foi menor que no grupo em interação (CYRF-01 = $12,85 \pm 7,73$ nm², MIRF-01 = $11,91 \pm 6,06$ nm²). Tal diferença foi estatisticamente significativa quando comparada controle e interação na cepa CYRF-01 ($p = 0,02$).

Ao analisar a distribuição da proporção de CLs por intervalos de área, foi verificado que o grupo controle CYRF-01 apresentou claramente uma prevalência de CLs com áreas menores (Fig. 12C, 65% dos CLs na CYRF-01 controle encontram-se no intervalo de 1-6 nm²). No grupo interação, em CYRF-01 foi observada uma distribuição homogênea dos CLs dentre os intervalos de área, enquanto em MIRF-01, houve o aparecimento de CLs com áreas dentro de intervalos maiores (25-30 nm² e 31-36 nm²) (Fig. 12C).

Em conjunto, os dados de MET mostraram que CLs de cianobactérias, além de sofrerem alteração em número (Fig. 12), podem também sofrer variações de tamanho em resposta à interação celular.

4.4.3 Vesículas de Membrana Externa em *C. raciborskii*

Nas análises por MET, uma característica marcante encontrada na cepa CYRF-01, controle e interação, foi a ocorrência de vesículas brotando da membrana externa para o meio extracelular (Fig. 9). Essas vesículas foram

observadas como estruturas arredondadas envoltas por membrana com aspecto trilaminar e exibindo conteúdo geralmente elétron-lúcido (Fig. 9A, Ai, B, Bi e C). As VMEs são típicas de bactérias gram-negativas e cianobactérias e estão envolvidas em diversos processos celulares, como, por exemplo, na comunicação celular (HAURAT; ELHENAWY; FELDMAN, 2015).

Análises quantitativas mostraram que as células em interação apresentaram maior proporção de VMEs (controle = $3,06 \pm 0,73$ VMEs/célula, interação = $9,44 \pm 2,34$ VMEs/célula, $p < 0,004$) e com maior perímetro (controle = $268,2 \pm 14,56$, Interação = $318,4 \pm 14,58$ μm , $p < 0,01$) (Fig. 9D e E). Vale ressaltar que, aparentemente, os CLs são observados na periferia citoplasmática, próximos da área de formação de vesículas (Fig. 9 A e Ai).

4.4.4 Grânulos de Polifosfato

Grânulos de Polifosfato foram vistos por MET como estruturas arredondadas com superfície irregular formadas por agregados elétron-densos de fosfato (Fig. 10A e B). Foi observada uma menor proporção de grânulos de polifosfato na cepa CYRF-01 em interação comparada com o controle ($p = 0,014$) (Fig. 10C). Em MIRF-01, não houve diferença significativa quando comparado o número de grânulos das células em interação e controle ($p = 0,589$) (Fig. 10C).

4.4.5 Área de Tilacoides

A MET revelou membranas de tilacoides no citoplasma de ambas as cepas de cianobactérias, no grupo controle e interação (Fig. 8, seta). Os tilacoides apareceram como invaginações da membrana, formando um sistema membranoso intracitoplasmático. Essas estruturas possuem pigmentos acessórios e fotossistemas responsáveis pela fotossíntese. Análises morfométricas mostraram que cepa CYRF-01 apresentou menor porcentagem de área celular ocupada por tilacoides na interação ($p < 0,0001$), enquanto a MIRF-01 não apresentou diferenças significativas ($p = 0,921$) (Fig. 13).

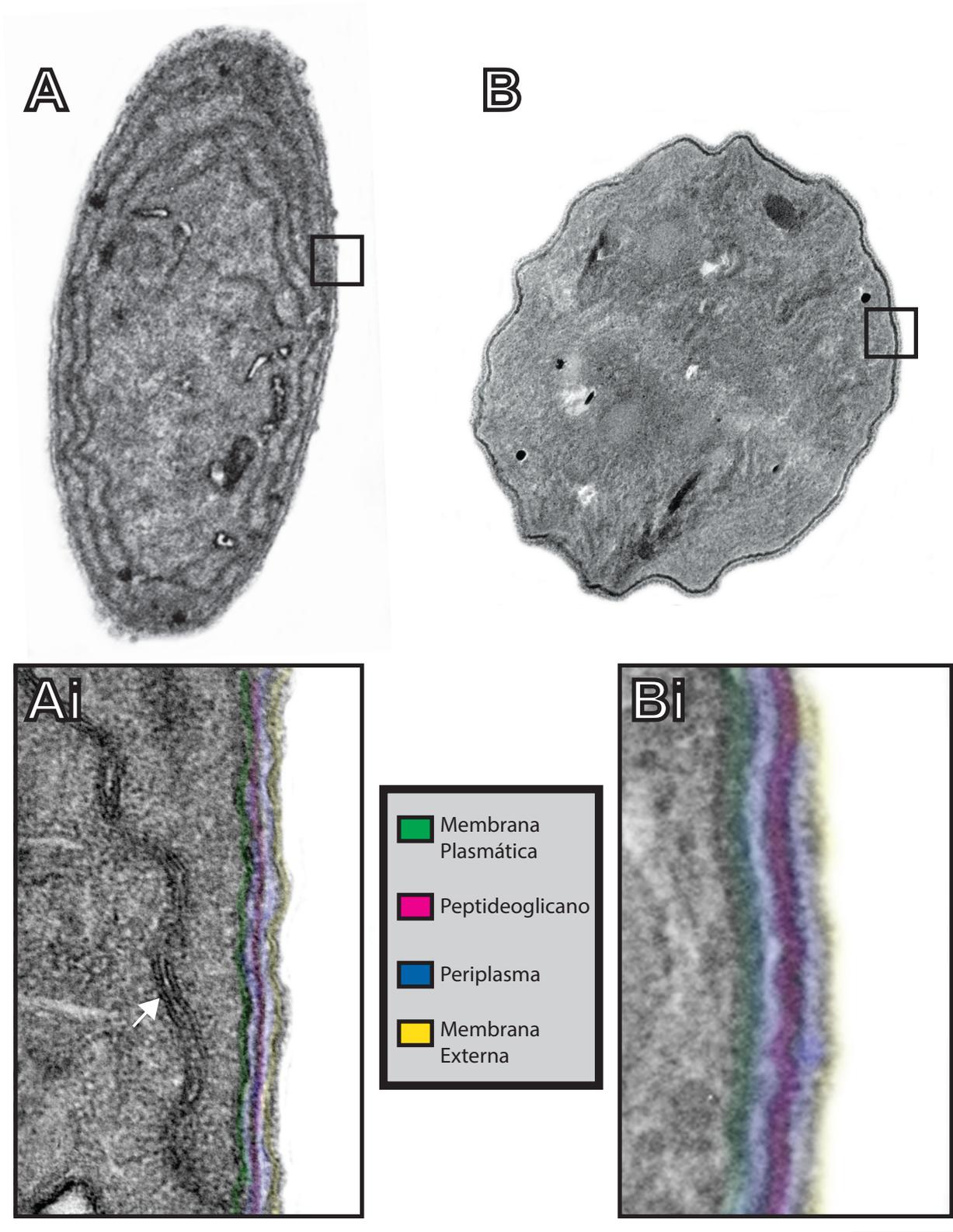


Figura 8 – Ultraestrutura de cepas *C. raciborskii* (A, CYRF-01) e *M. aeruginosa* (B, MIRF-01) em cultura. Observe nos detalhes (Ai e Bi) o envoltório celular tipicamente gram-negativo em ambas as cepas, formado por membrana plasmática (verde), periplasma (azul) com camada de peptideoglicano (rosa) e membrana externa (amarelo). Note que o peptideoglicano apresenta-se como uma camada mais delgada entre a membrana plasmática e a membrana externa no envoltório de *C. raciborskii* (Ai), enquanto que em *M. aeruginosa* ele mostrou-se geralmente como uma camada bastante elétron-densa e espessa. A seta indica a ocorrência de tilacoides no citoplasma. As cepas de cianobactérias foram cultivadas isoladamente durante 24h, fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Barra = 200 nm (A, B), 80 nm (Ai, Bi).

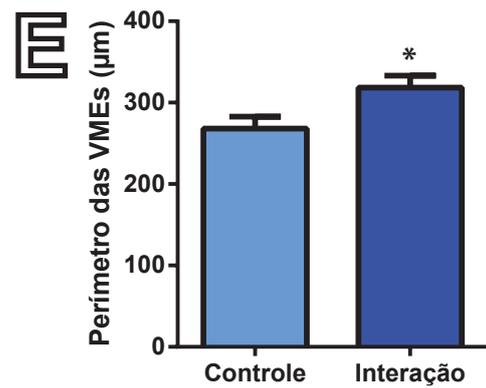
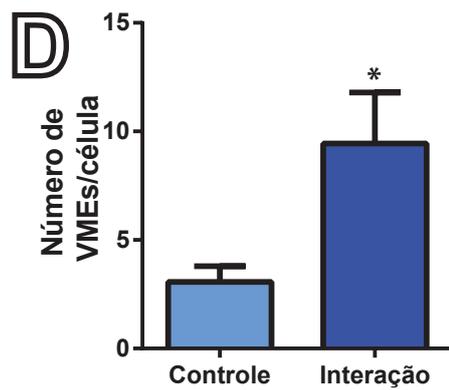
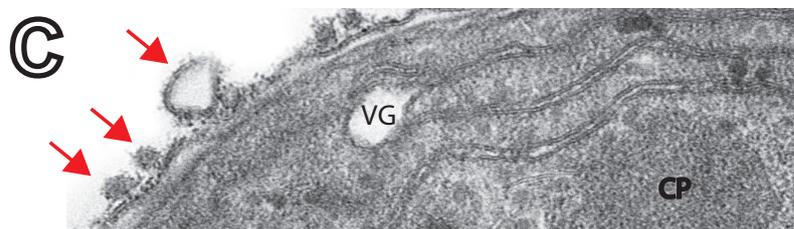
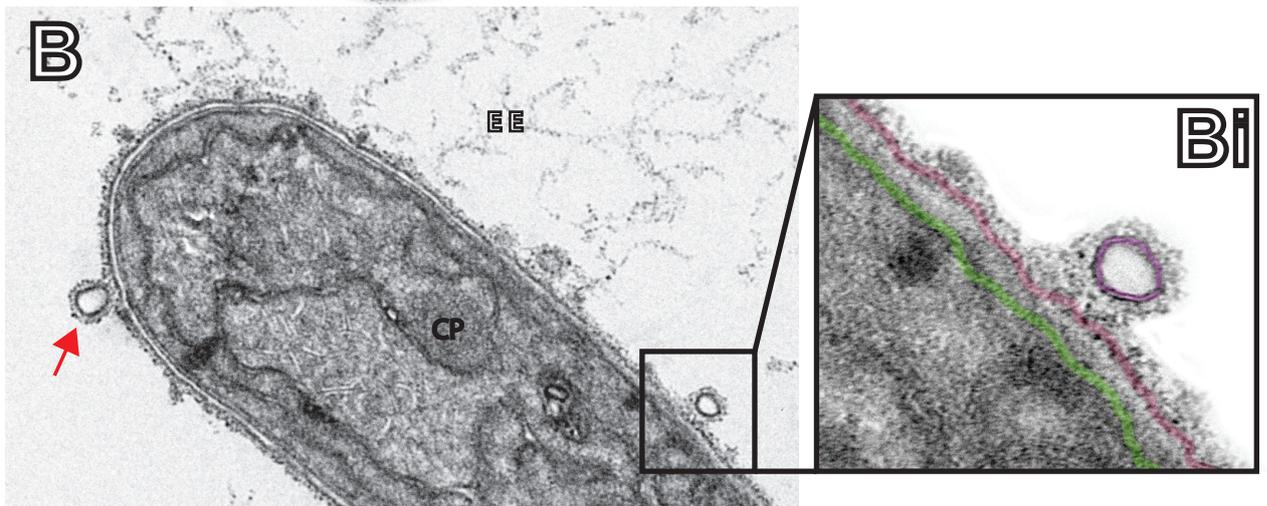
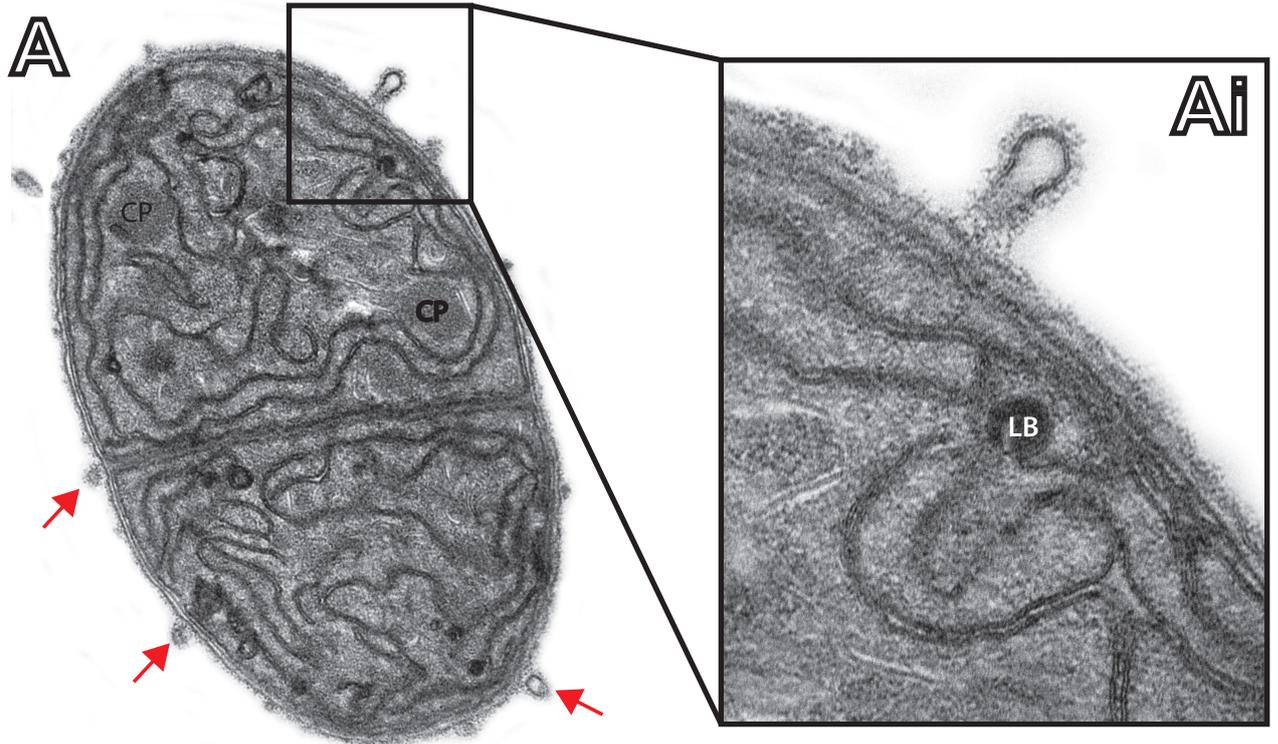


Figura 9 – Vesículas de membrana externa em *C. raciborskii* (CYRF-01) observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Em (A, B e C) observe vesículas de membrana externa (VMEs) brotando do envoltório celular de CYRF-01. Note nos detalhes (Ai e Bi) que as vesículas são formadas a partir da membrana externa (Ai, rosa) da cianobactéria. Outras estruturas típicas de cianobactérias são indicadas: corpos poliédricos (CP), vesículas de gás (VG) e corpúsculos lipídicos (CLs). Em (Bi), a membrana plasmática foi delineada em verde. Extracelularmente, observe a camada de exopolímeros a qual se apresenta como uma região amorfa, aderida à membrana externa. Em (D), gráfico mostrando número de VMEs por células e em (E) o perímetro das VMEs. Barra = 380 nm (A), 300 nm (B), 120 nm (Ai, Bi), 250 nm (C).

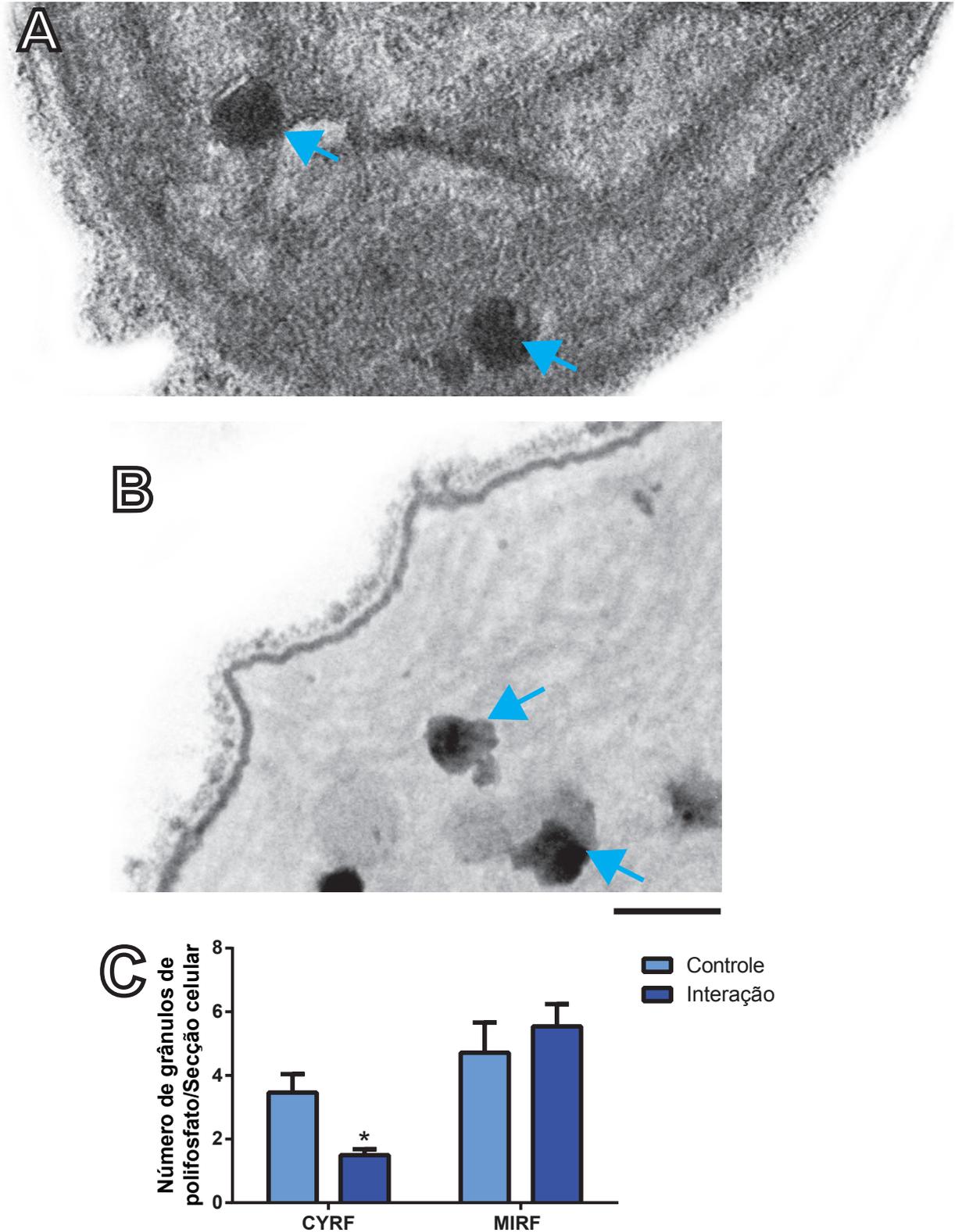


Figura 10 – Grânulos de polifosfato em *C. raciborskii* (A) e *M. aeruginosa* (B). Em (A e B), observe os grânulos arredondados com superfície irregular formados por agregados elétrons-densos (setas). Em (C), gráfico mostrando a redução de grânulos de polifosfato por secção celular em *C. raciborskii* (CYRF) após interação. (*) Diferença significativa, $p=0,014$. Barra = 250 nm (A,B).

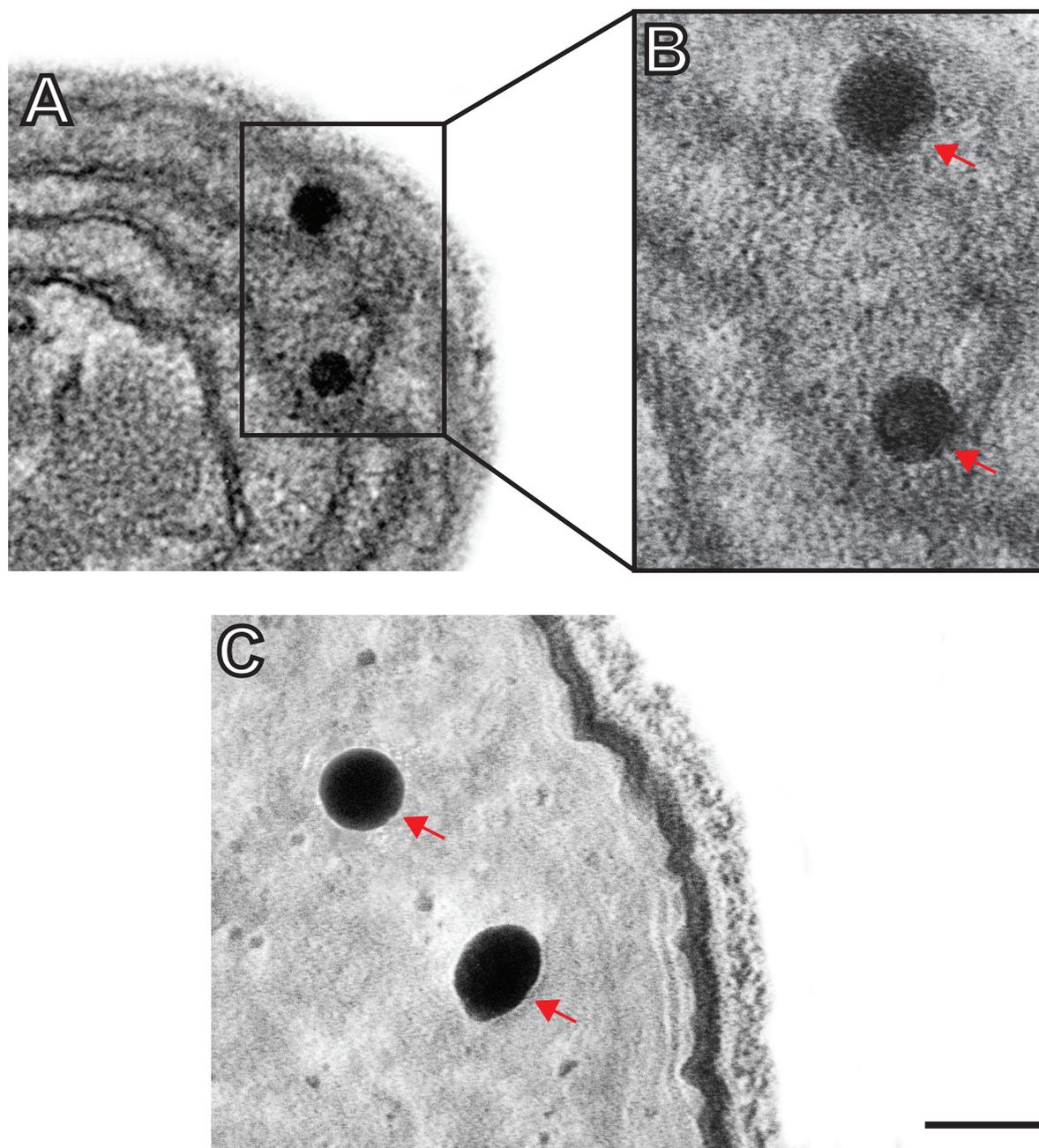


Figura 11 – Ultraestrutura de corpúsculos lipídicos de *C. raciborskii* (A) e *M. aeruginosa* (B). Os CLs aparecem como organelas elétron-densas arredondadas no citoplasma de ambas as cianobactérias. As cepas CYRF-01 e MIRF-01 foram coradas em interação por 24h, as amostras coletadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Barra = 250 nm (A), 170 nm (B, C).

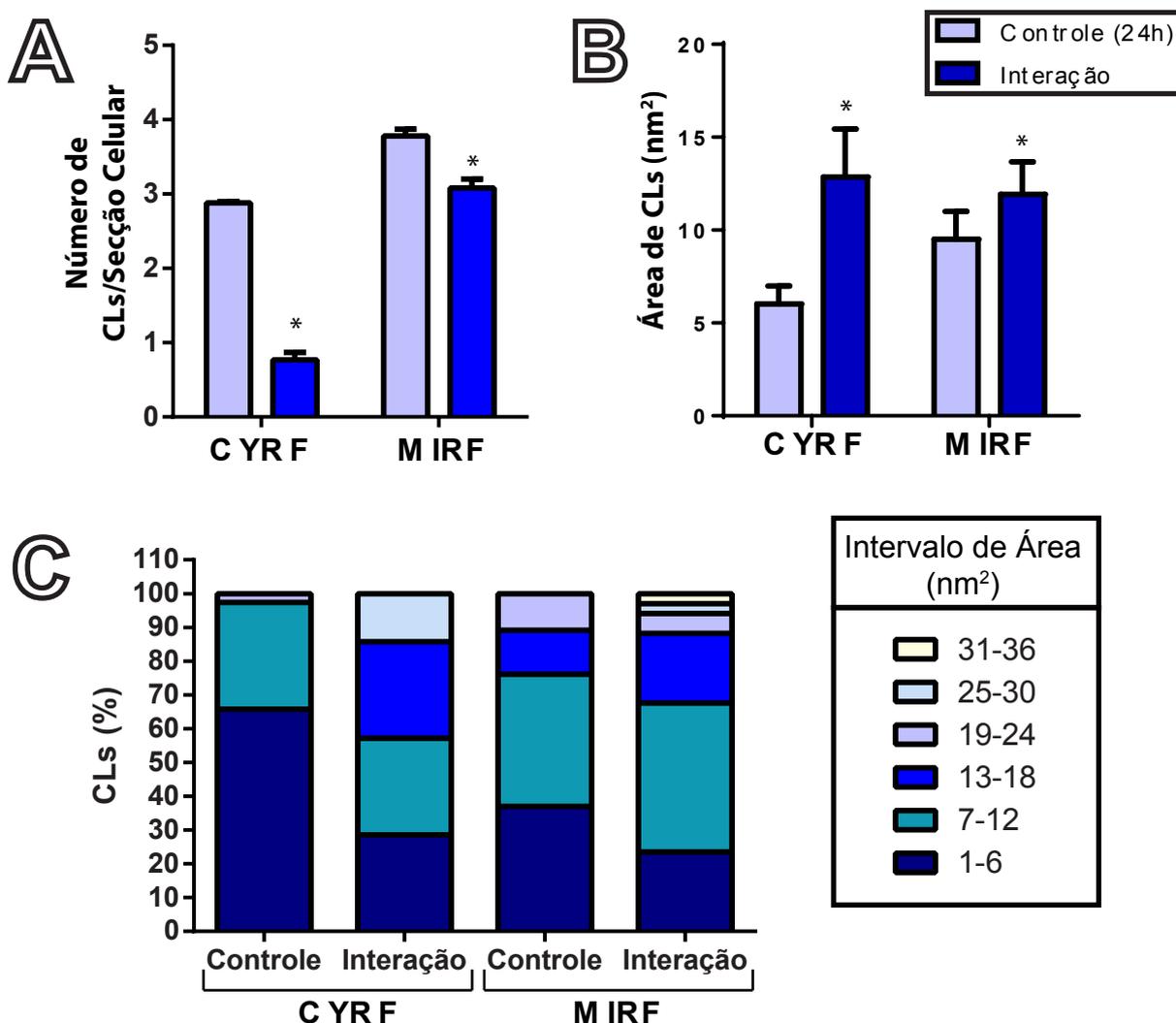


Figura 12 – Análises morfométricas e quantitativas de corpúsculos lipídicos em *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* por microscopia eletrônica de transmissão. (A) mostra número de corpúsculos lipídicos por secção celular e (B) a área média de corpúsculos lipídicos. No gráfico (C) observe o intervalo de área de corpúsculos lipídicos em ambas as cepas, nos grupos interação e controle. Amostras dos grupos controle e interação (24h) foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão e as micrografias analisadas com o software Image J. Os dados quantitativos representam a média \pm EP e (*) indica diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

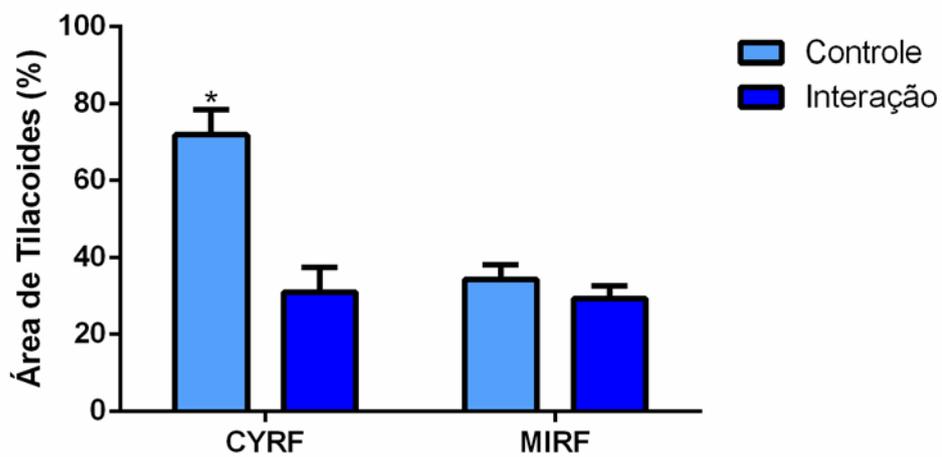


Figura 13 - Porcentagem média da área celular ocupada por tilacóides em *Cylindrospermopsis raciborskii* (CYRF-01) e *Microsistys aeruginosa* (MIRF-01). Um número total de 70 eletromicrografias de cianobactérias dos grupos controle e em interação foi obtido e as áreas ocupadas por tilacóides foram medidas com o software Image J.

5 DISCUSSÃO

5.1. DENSIDADE X VIABILIDADE CELULAR

É sugerido que as interações entre cianobactérias em mesmo ambiente ocorrem principalmente por competição através de interações bioquímicas (LEGRAND et al., 2003). Neste caso, uma espécie envolvida produz compostos que inibem o crescimento populacional de outra espécie, sendo este efeito conhecido por alelopatia (LEGRAND et al., 2003). Recentemente, foi mostrado que aleloquímicos de culturas mistas de *C. raciborskii* (CYRF-01) e *M. aeruginosa* (MIRF-01), inibem o crescimento e estimulam a formação de colônias em MIRF-01 (MELLO et al., 2012). Desta forma, o efeito alelopático de CYRF-01 tem sido o principal motivo para explicar sua dominância e alterações na dinâmica de densidade de MIRF-01 quando estas cianobactérias encontram-se em interação em ecossistemas naturais (FIGUEREDO et al., 2007; MELLO et al., 2012).

No presente estudo, as análises de densidade foram realizadas por contagem em ML e mostraram que a interação de MIRF-01 e CYRF-01 durante 24 h não afetou a densidade celular (Fig. 5). SANTOS (2009), investigando o efeito da interação de *M. aeruginosa* e *C. raciborskii* em diferentes cepas tóxicas e atóxicas, verificou uma modificação no crescimento das culturas ao reduzir em até 22% a velocidade de crescimento das espécies, em 10 dias. RZYMSKI et al. (2014) também encontrou redução de crescimento quando estas duas espécies de cianobactérias foram cultivadas em conjunto. Outros trabalhos analisando padrões de crescimento de outras espécies de cianobactérias, cultivadas em conjunto, observaram também alterações na densidade ao longo do processo de interação (IKAWA; HANEY; SASNER, 1996; LIU et al., 2013). A interação entre cianobactérias e outros organismos também pode provocar efeitos no crescimento das populações envolvidas (JANG; HA; TAKAMURA, 2007; MA et al., 2015). Vem sendo demonstrado, inclusive, que aleloquímicos liberados por *M. aeruginosa* são capazes de inibir o crescimento de plantas quando estas espécies são cultivadas em conjunto (JANG et al., 2007).

Levando em conta que a maioria dos estudos realizados sobre a interação de cianobactérias utilizaram tempos maiores de cultivo, o fato de não encontrarmos alterações na densidade celular no presente estudo pode estar relacionado ao tempo de interação utilizado (24 h). A escolha por esse tempo foi feita objetivando analisar a interação dentro do tempo de uma geração das cianobactérias em cultura. Análises prévias do Grupo de Pesquisas em Ecologia Aquática/UFJF encontraram que o tempo de geração de ambas as cepas quando cultivadas em separado varia aproximadamente de 24 a 36 h.

Por outro lado, é compreendido que os respostas na densidade celular provocados por efeitos alelopáticos em cianobactérias é dependente da cepas utilizadas. MARINHO; SOUZA; LÜRLING (2013) relatam que exsudados de culturas mistas de *Microcystis* (MIRF) e *Cylindrospermopsis* (LEA) não afetam crescimento de nenhuma das cepas.

A avaliação do número de células de cianobactérias é usual na ecologia para determinar a densidade e abundância de cianobactérias em ambientes naturais e culturas. Esta análise geralmente é feita de forma direta pela contagem em microscópio do número de filamentos ou indireta por quantificação de clorofila a (GREGOR; MARŠÁLEK, 2004; TAVARES; ROCHA, 2003). Contudo, essas avaliações desconsideram aspectos fisiológicos das cianobactérias, os quais podem interferir na interpretação dos resultados de densidade celular. Portanto, tem sido considerado o uso de marcadores de viabilidade para estudo quantitativo de cianobactérias em ambientes naturais e culturas (ZAMYADI et al., 2015; ZHU; XU, 2013).

No presente trabalho, utilizamos os marcadores do kit LIVE/DEAD *BacLight* para estudo da viabilidade celular. Esse kit é indicado para avaliação da integridade de membrana em microrganismos, devido ao seu procedimento prático e de rápida distinção entre células viáveis e não viáveis (BOULOS, L. et al., 1999; DECAMP; RAJENDRAN, 1998; FREESE, H. M.; KARSTEN, U.; SCHUMANN, R., 2006; HAGLUND et al., 2003). No entanto, é a primeira vez que este método foi usado para avaliar a viabilidade celular de cianobactérias em cultura durante interação interespecífica entre *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*.

A utilização do Kit Live/Dead *BacLight* aliada ao método de citocentrifugação para preparação das amostras, possibilitou a visualização de células viáveis e inviáveis por microscopia de fluorescência nos grupos interação e controle.

Análises quantitativas mostraram que a proporção de células inviáveis aumentou quando as duas cepas foram colocadas em interação por 24h ($p < 0,05$) (Fig. 6 C). Este dado indica que, apesar de não ter sido encontrada variação na densidade celular, a interação entre cepas de cianobactérias, afeta a permeabilidade de membrana e conseqüentemente a viabilidade destes organismos. Ressalta-se que tais análises permitem a detecção de alterações celulares relacionadas à morte anteriormente à lise celular. Células com membranas não íntegras não podem manter um gradiente eletroquímico que gera o potencial de membrana, podendo ser classificadas como mortas. Desta forma, contagens que diferenciam entre cianobactérias vivas e mortas são fundamentais para determinação do estado fisiológico destas células (SEO; AHN; ZO, 2010). Nossas análises indicam que a cepa MIRF-01 foi mais alterada pela interação já que apresentou maior porcentagem média de células inviáveis/mortas ($10,81 \pm 3,11\%$) em comparação com a CYRF-01 ($7,74 \pm 1,47\%$). De fato, já é reconhecido que os efeitos alelopáticos de CYRF-01 sobre MIRF-01 podem alterar, além do crescimento, outros fatores possivelmente relacionados com a fisiologia cianobacteriana (MELLO et al., 2012; RZYMSKI et al., 2014). Portanto, a viabilidade alterada de MIRF-01 pode ser causada pelo efeito alopático de CYRF-01 sobre MIRF-01.

Adicionalmente, foi observada a ocorrência de células viáveis e inviáveis em um mesmo filamento de CYRF-01. Estudo anterior documentou que todas as células em um filamento encontram-se no mesmo estado fisiológico (AGUSTI et al., 2006). Porém, nossos resultados identificaram que as células em uma colônia podem apresentar-se em estados fisiológicos distintos. Estes dados corroboram com observações anteriores (JOHNSON et al., 2015; NOYMA, 2009), e indicam que as células em uma colônia podem apresentar respostas fisiológicas individuais a estímulos estressores.

Tomando em conjunto os dados de densidade e viabilidade celular, podemos inferir que dentro de uma geração (tempo de 24 h) as respostas

iniciais da interação sobre as cianobactérias envolvidas ocorrem a nível fisiológico de cada célula, mesmo ainda não sendo detectados em nível de população. Assim, espera-se que, aumentando-se o tempo de exposição à interação, os efeitos densidade celular, conforme demonstrado em trabalhos anteriores (MARINHO et al., 2013; RZYMSKI et al., 2014; SANTOS, 2009). No entanto, estudos futuros são necessários para se investigar essa possibilidade.

5.2 CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Os CLs nas cianobactérias *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* em interação foram analisados por ML e MET. Através de ambas as técnicas, estas organelas apresentaram-se como estruturas arredondadas no citoplasma das cianobactérias e foram observados tanto nos controles quanto na interação entre as duas cepas.

A técnica de citocentrifugação para o preparo das amostras e a coloração com ORO mostraram-se eficazes para a detecção de CLs por ML. O marcador ORO é rotineiramente utilizado para detecção de CLs em diversos tipos celulares (CHIARINI-GARCIA; MELO, 2011; KOOPMAN et al., 2001), porém é a primeira vez que este é usado para avaliação de CLs em cianobactérias. Os CLs apareceram em CYRF-01 e MIRF-01 como estruturas arredondadas diminutas coradas em vermelho no interior das células.

A MET revelou a presença de CLs como estruturas elétron-densas de tamanhos variados no citoplasma das células. Em células eucarióticas, já foi verificado que a elétron-densidade dos CLs pode estar relacionada com sua composição (DIAS et al., 2014). Nestes tipos celulares, a constituição dos CLs e sua elétron-densidade podem ainda variar de acordo com condições às quais a célula está submetida e em resposta à diferentes estímulos (DIAS et al., 2014).

Procariotos e cianobactérias possuem a habilidade de armazenar lipídios neutros e fosfolipídios nos CLs (KAISER et al., 2013). Por exemplo, um estudo recente demonstrou que a composição lipídica de CLs de *Nostoc punctiforme* é basicamente formada por lipídeos neutros (PERAMUNA; SUMMERS, 2014).

No entanto, investigações moleculares mais específicas necessitam ser realizadas para se entender precisamente o conteúdo lipídico dos CLs nas cepas aqui estudadas.

No presente trabalho, dados quantitativos por ML demonstraram que os CLs podem aumentar ou reduzir em número durante o crescimento destas células em culturas isoladas, dependendo da cepa. De acordo com nossos dados podemos inferir que em CIRF ocorre uma tendência de aumento no número de CLs (aproximadamente 69%) enquanto em MIRF-01 uma tendência de redução (aproximadamente 54%) durante o cultivo isolado das cepas por 24h. Estudo anterior estudando CLs em cianobactérias da espécie *Nostoc punctiforme* em culturas demonstraram um aumento do número de CLs ao longo do crescimento exponencial até a fase estacionária (PERAMUNA; SUMMERS, 2014). Porém, esse o único registro na literatura que estuda a dinâmica de CLs ao longo do tempo em cianobactérias. Entretanto, já foi indicado que a diferença no número de CLs pode variar de acordo com a espécie (VAN DE MEENE et al., 2006).

Nossos resultados apontaram que apesar de não haver diferença significativa no número de CLs em CYRF-01 entre 0h e 24h de interação, houve uma redução de 61,5% no grupo interação quando comparamos com o controle 24h. Assim, a tendência de aumento de CLs em CIRF foi alterada pela interação com MIRF-01. Em contraste, em MIRF-01 foi verificada uma redução na proporção de CLs (94 %) de 0h para 24h de interação e de 24 h controle para interação (84%). Levando em conta a tendência padrão de número de CLs ao longo das 24h nos controles, podemos constatar uma maior redução entre o controle nas 24h e o grupo interação.

Verificado que a alteração no número de CLs ocorre naturalmente durante o cultivo isolado das cepas por 24h e que a maior diferença na proporção de corpúsculos ocorreu entre o grupo controle e interação nas 24h, analisamos quantitativamente os CLs por MET nesses grupos. Assim, a MET revelou uma redução de CLs em ambas as cepas no grupo em interação, corroborando com as análises por ML.

Adicionalmente, análises morfométricas por MET mostraram que a área média dos CLs nas células do grupo em interação foi significativamente maior

que nos controles em CYRF-01. De fato, análises de distribuição de áreas de CLs mostraram claramente uma prevalência de CLs com áreas menores no grupo controle em CYRF-01. Em contrapartida, apesar de não haver diferenças significativas entre os grupos controle e interação em MIRF-01 houve o aparecimento de CLs com áreas dentro de intervalos maiores no grupo em interação (Fig. 12).

Em conjunto, nossos resultados quantitativos, tanto por ML quanto MET demonstraram que: (1) quando cultivadas isoladamente por 24 h, CYRF-01 apresenta uma tendência de aumento no número de CLs, enquanto MIRF-01 uma redução no número de CLs; (2) a interação entre as cianobactérias durante 24h, leva à redução do número de CLs, em ambas as cepas e (3) ocorre um aumento na área de CLs em ambas as cepas quando em interação, sendo mais proeminente na cepa CYRF-01.

Em células eucarióticas, é reconhecido que a proporção de CLs pode alterar de acordo com as alterações as quais as células estão submetidas (POL et al., 2014). Em cianobactérias, em um estudo anterior do grupo de biologia celular e ecologia aquática/UFJF, foi observada uma redução de CLs em *C. raciborskii* submetidas à radiação ultravioleta (NOYMA, 2009).

A estabilidade da dominância de *C. raciborskii*, em ecossistemas naturais e culturas, tem sido atribuída pela produção e descarga de metabólitos secundários (aleloquímicos) inibidores de outros organismos competidores, entre eles *M. aeruginosa* (FIGUEREDO et al., 2007; MELLO et al., 2012). O fato das células estarem mobilizando seu metabolismo energético para produção desses compostos poderia levar à alteração do aporte energético estocado nos CLs. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de outros produtos, além de lipídios, estarem sendo mobilizados em CLs, em cianobactérias. Em células eucarióticas, diversas proteínas com diferentes funções, encontram-se presentes em CLs (revisado por DIAS et al., 2014; MELO, R. et al., 2006; MELO, R. C. et al., 2011)

Em contrapartida, vale ressaltar que as duas cepas utilizadas são capazes de produzir toxinas, e dados da literatura demonstram que toxinas extracelulares podem atuar como aleloquímicos na competição com outros organismos (JANG et al., 2007; RZYMSKI et al., 2014; VASSILAKAKI;

PFLUGMACHER, 2008). Em outros gêneros de cianobactérias, Shiet al, 1995, documentaram inclusive a presença de cianotoxinas em CLs (SHI et al., 1995). Desta forma, o papel do CLs pode ter central em outros processos, além do metabolismo energético. Portanto, a redução dos CLs verificada no presente trabalho pode estar de alguma forma relacionada à produção de compostos utilizados em mecanismos adaptativos para competição por nicho.

A visão de CLs como estruturas estáticas de estocagem em procariontos vem sendo modificada com a constatação de que estas organelas podem apresentar papéis mais dinâmicos, como na biossíntese de lipídios, no tráfego de membranas, sinalização e degradação de proteínas (DING et al., 2012), conforme já relatado em eucariotos (MELO, R. C. et al., 2011). Nossos resultados reforçam que CLs de cianobactérias são organelas dinâmicas, capazes de alterar seu número e tamanho em resposta à estímulos do meio. Desta forma, sugere-se que o papel destas organelas em cianobactérias pode ser mais amplo, requerendo investigações futuras para completo entendimento.

5.3 ULTRAESTRUTURA GERAL DE CIANOBACTÉRIAS

A ultraestrutura de ambas as cepas, CYRF-01 e MYRF-01, foram analisadas por MET. A área celular de *M. aeruginosa* foi maior em comparação com a área de *C. raciborskii* ($p < 0,05$). Este fato pode ser devido às características morfológicas específicas de cada espécie. Ambas as cepas estudadas são cianobactérias coloniais, porém as células de *C. raciborskii* são cilíndricas e formam colônias filamentosas, enquanto *M. aeruginosa* apresenta células esféricas que formam colônias em grumos (CAIOLA; PELLEGRINI, 1984; EVERSON et al., 2011; SHAFIK et al., 2003).

As cianobactérias mostraram envoltório celular tipicamente gram-negativo. Apesar da camada de peptidoglicano de *M. aeruginosa* ter se mostrado bastante evidente, o envoltório de *M. aeruginosa* mostrou-se mais espesso comparado ao de *C. raciborskii* (Fig. 8A e B). No geral, as cianobactérias apresentam envoltório celular parecidos com bactérias gram-negativas na composição, porém possuem características similares a

envoltórios gram-positivos, como a espessura mais proeminente (SCIUTO; MORO, 2015). Neste sentido, a espessura característica do envoltório celular também se encontra relacionada com a espécie de cianobactéria em questão (SCIUTO; MORO, 2015), conforme foi mostrado no presente trabalho.

De acordo como discutido anteriormente, nossos dados de viabilidade celular por microscopia de fluorescência com o uso do marcador *BacLight* indicaram que o tempo de interação provocou alterações na integridade de membrana. Porém, não foram detectados danos perceptíveis na ultraestrutura do envoltório celular quando as cianobactérias foram analisadas por MET. Este fato pode ser explicado pelos corantes presentes nesse marcador serem capazes de detectar alterações na membrana plasmática anteriores à morte e ao rompimento efetivo da célula ou do envoltório celular (SILVA et al., 2014). Desta forma, apesar de a interação ter levado à alteração da permeabilidade de membrana e conseqüente perda de viabilidade celular, a membrana e o envoltório celular não apresentaram danos ultraestruturais.

Além disso, o citoplasma de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* foi caracterizado pela presença de uma variedade de estruturas frequentemente encontradas em cianobactérias. Porém, nos grupos em interação estruturas como os CLs (já discutidos), as VMEs, os grânulos de fosfato e as membranas de tilacoides apareceram alterados em proporção, tamanho ou ocorrência.

5.3.1 Vesículas de Membrana Externa (VMEs) em *C. raciborskii*

As VMEs são estruturas formadas a partir da membrana externa de procariotos com envoltório celular tipicamente gram-negativos. Essas estruturas tem sido reconhecidas e estudadas principalmente em bactérias heterotróficas e suas funções sugeridas incluem: tráfego de toxinas e proteínas, transferência de DNA e comunicação celular (KULP; KUEHN, 2010; MASHBURN; WHITELEY, 2005). Entretanto, a formação de VMEs por microrganismos fotoautotróficos foi apenas recentemente descrita por BILLER et al. (2014) em cianobactéria do gênero *Prochlorococcus* e *Synechococcus*. Nestas cianobactérias, os autores documentaram a formação de VMEs contendo proteínas, DNA e RNA, além de demonstrarem sua abundância em

amostras de ecossistemas marinhos costeiros (BILLER et al., 2014). Essa evidência abre novas perspectivas para o fluxo de informação, energia e biomoléculas em ecossistemas microbianos.

Interessantemente, no presente trabalho observamos a ocorrência e formação de VMEs em *C. raciborskii*. Além disso, foi verificado um aumento tanto no número (aproximadamente 68%) como no tamanho de VMEs após as 24 h de interação com *M. aeruginosa*. Desta forma, podemos inferir que *C. raciborskii* respondeu a estímulos ambientais provocados pela interação, com formação aumentada de VMEs.

Acredita-se que em microrganismos, a formação de VMEs pode estar relacionada com respostas adaptativas à sobrevivência devido a variações de fatores ambientais, como na competição por nichos (KULP; KUEHN, 2010; MCBROOM; KUEHN, 2007). Assim, é reconhecido que o conteúdo vesicular, o qual pode conter compostos tóxicos, fagos virais ou proteínas ativas, estão diretamente relacionados com mecanismo de defesa após a exposição a condições estressantes (ELLIS; KUEHN, 2010; MCBROOM; KUEHN, 2007). Além disso, já foi encontrado que microrganismos competidores no mesmo nicho ecológico são capazes de secretar moléculas antimicrobianas dentro de VMEs, que irão atuar seletivamente na morte de outras espécies (KADURUGAMUWA et al., 1998; LI; CLARKE; BEVERIDGE, 1998). É documentado que durante a interação entre as duas cepas (CYRF e MIRF), ocorre a produção de metabólitos secundários por *C. raciborskii*, responsáveis pela inibição de *M. aeruginosa*. Este mecanismo vem sendo descrito como característica adaptativa à competição. Logo, sugere-se que o aumento da produção e tamanho de vesículas por *C. raciborskii* pode estar relacionado com mecanismos de secreção de metabólitos aleloquímicos para competição por nicho.

Adicionalmente, no presente estudo foi verificado que os CLs foram observados na periferia citoplasmática, próximos da área de formação de vesículas (Fig. 9A e Ai). Estudo anterior verificou o mesmo padrão de distribuição de CLs por ML (PERAMUNA; SUMMERS, 2014). Este dado reforça a idéia de que a resposta de CLs possa estar relacionada à produção de

compostos que poderão ser exportados para o meio extracelular, possivelmente através da secreção por VMEs.

Vale salientar que este é o primeiro registro da formação de VMEs em *C. raciborskii* (CYRF-01) em situação de crescimento em cultura e após interação celular com outra espécie de cianobactéria. Estes achados são importantes para o entendimento de respostas de cianobactérias à estímulos ambientais.

5.3.2 Grânulos de Polifosfato

Os grânulos de polifosfato são inclusões citoplasmáticas geralmente encontradas em diversos microrganismos. Estas estruturas armazenam principalmente fósforo, mas podem conter ainda potássio, cálcio e magnésio, além de serem capazes de acumular metais (KROMKAMP, 1987). A reserva de fosfato em fotossintetizantes se faz necessária para a síntese de ácidos nucleicos e fosfolípidios, ou como fonte de energia para síntese de ATP (HAROLD; BAARDA, 1966).

No presente estudo, verificamos por MET a ocorrência de grânulos de polifosfato em ambas cianobactérias, nos grupos controle e interação. Os grânulos de polifosfato apareceram como grânulos arredondados com formato irregular, caracterizados como agregados elétron-densos de fosfato. Esta característica morfologia é típica de grânulos de polifosfato, inclusive em outros gêneros de cianobactérias (VAHTERA; LAAMANEN; RINTALA, 2007).

Na literatura, a maioria dos estudos que mostram a dinâmica destas estruturas em cianobactérias é realizada objetivando os efeitos da privação de nutrientes ou acumulação e resposta a diversos metais sobre as populações de cianobactérias (PETTERSSON; HÄLLBOM; BERGMAN, 1988; SUROSZ; PALINSKA, 2004). Por exemplo, foi verificado em *Anabaena variabilis* e *Synechococcus* que a maior mudança ultraestrutural foi a perda de grânulos de polifosfato, e contrariamente o excesso de fósforo favoreceu a formação dos mesmos (HEALEY, 1982; LAWRY; JENSEN, 1979). A síntese e biogênese de grânulos de polifosfato, como resposta adaptativa está relacionada com a disponibilidade de fosfato no meio. Estudos anteriores mostram que *C.*

raciborskii e *M. aeruginosa*, quando cultivadas em conjunto podem competir por nutrientes, como o fosfato. Neste caso, foi inferido que *C. raciborskii* apresenta respostas adaptativas vantajosas que permitem sua dominância no meio em condições de baixa disponibilidade de fosfato (MARINHO et al., 2013). Essa característica pode estar associada com um eficiente mecanismo de absorção e armazenamento deste nutriente, quando comparado com outras cianobactérias (NOVICS et al., 2000; WU, Z.; SHI; LI, 2009). Além disso, o fosfato armazenado nos grânulos podem ser utilizados para síntese de diversos compostos, inclusive para produção de ATP. Em situações de estresse, as cianobactérias deixam de utilizar sua fonte energética para processos fotossintéticos remanejando-as para outros mecanismos de defesa, como em situações de competição.

Desta forma, nossos dados indicam que a diminuição do número de grânulos de polifosfato em CYRF-01 pode apresentar relações intrínsecas com a competição de nutrientes ou com a mobilização desta reserva para mecanismos que necessitem de maior demanda energética, durante a interação com MIRF-01.

5.3.3 Área de Tilacoides

Em cianobactérias, as membranas de tilacoides são os principais locais da cadeia transportadora de elétrons e onde ocorrem as reações fotossintéticas (MULLINEAUX, 2014). O arranjo e número de tilacoides são taxonomicamente neste grupo de microrganismos importantes por ser considerada uma característica celular estável (KOMÁREK; VASLAVSKÁ, 1991). Diferente de outras cianobactérias, como *Annamiaetoxica* gen. et sp. nov., que apresentam tilacoides concêntricos, *C. raciborskii* e *M. aeruginosa* apresentam essas estruturas irregulares (NGUYEN et al., 2013).

É relatado que *C. raciborskii* apresenta maior eficiência fotossintética que *M. aeruginosa* (WU, Z. et al., 2009). Porém, a submissão a fatores estressantes pode comprometer direta ou indiretamente os tilacoides nessa espécie, como exposição à radiação UV (CHAUHAN; PANDEY; SINGHAL, 1998; RAJAGOPAL et al., 1998; SIX et al., 2007). Trabalho anterior do Grupo

de Biologia Celular/UFJF em conjunto com o Grupo de Pesquisas em Ecologia Aquática/UFJF demonstrou que o aparato fotossintético de pode ser potencialmente alterado pela radiação UV (NOYMA, 2009). Este estudo, mostrou por MET redução drástica da área de tilacoides e alterações estruturais nos ficobilissomos em *C. raciborskii* em exposição à radiação UV (NOYMA, 2009).

Além disso, alteração de características do meio, como na concentração de nutrientes, pode afetar diretamente os tilacoides (STEVENS; NIERZWICKI-BAUER; BALKWILL, 1985; WU, Z. et al., 2009). Análises por MET mostraram que cepa CYRF-01 apresentou menor porcentagem de área celular ocupada por tilacoides na interação ($p < 0,0001$), enquanto a MIRF-01 não apresentou diferenças significativas ($p = 0,921$). SOARES et al. (2009) verificaram alterações do aparato fotossintético de uma cepa de *C. raciborskii* (CYRF-01) pelo “filtrado celular” de sua cultura mista com uma cepa de *M. aeruginosa* (MIRF-01). Foi mostrado que aleloquímicos produzidos durante a interação de cianobactérias podem provocar danos nos tilacoides e levar à disfunção fotossintética (WU, Y. et al., 2011). Também já foram relatadas outras alterações celulares nos pigmentos acessórios e em algumas estruturas durante interações com cianobactérias em privação de nutrientes (STEVENS et al., 1985).

Deve-se levar em consideração que as membranas dos tilacoides podem ainda ser realocadas para outros compartimentos celulares, como resultado de variações metabólicas provocadas pela disponibilidade de nutrientes. Foi verificado que em cianobactérias submetidas a baixa concentração de nutrientes, durante crescimento normal, os CLs podem atuar como compartimentos de estocagem ou reciclagem de membranas de tilacoides (PERAMUNA; SUMMERS, 2014). Este mecanismo possivelmente pode servir para aumento do aporte energético ou até mesmo síntese de outras moléculas.

Contudo, sugere-se que a redução da área de tilacoides observada em CYRF-01 tenha sido resultado de compostos produzidos sob estresse ou alterações metabólicas celulares, causados pela competição entre as duas cianobactérias.

6 CONCLUSÕES

- A interação interespecífica entre *C. raciborskii* (CYRF-01) e *M. aeruginosa* (MIRF-01) em cultura durante 24 h não afeta a densidade celular, porém induz alterações na permeabilidade de membrana destas espécies de cianobactérias, conforme detectado através dos resultados de viabilidade celular. Os resultados de viabilidade celular por microscopia de fluorescência mostram que a cepa MIRF-01 apresenta maior proporção de células inviáveis que a cepa CYRF-01. Além disso, o uso do kit *BacLight* identificou que as células em uma colônia podem apresentar-se em estados fisiológicos diferentes, respondendo distintivamente a estímulos estressores.

- A interação interespecífica por 24 h induz a redução do número e aumento da área de CLs estes dados mostram que CLs de cianobactérias não são em *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, conforme demonstrado por análises por ML e MET. Além disso, foi observado que quando cultivada isoladamente (24 h), a cepa CYRF-01 apresenta uma tendência de aumento no número de CLs e MIRF-01 uma redução.

- A MET revelou diferenças estruturais entre CYRF-01 e MIRF-01, principalmente no tamanho da célula e espessura do envoltório celular. Além disso, foi observada no citoplasma de ambas as cepas a presença de uma variedade de estruturas frequentemente encontradas em cianobactérias. Estas análises revelaram nos grupos em interação que outras estruturas, como as VMEs, os grânulos de fosfato e as membranas de tilacoides respondem à interação com alterações em termos de número, tamanho e ocorrência. Foi observada por MET, pela primeira vez, a formação de VMEs em *C. raciborskii* (CYRF-01) em situação de crescimento em cultura e após interação celular com *M. aeruginosa*. Além disso, foi verificado que a interação por 24 h provoca um aumento considerável tanto no número quanto no tamanho de VMEs. A MET também revelou a ocorrência de grânulos de polifosfato e membranas de tilacoides em ambas cianobactérias. Dados quantitativos mostram que a

interação induz a diminuição tanto do número de grânulos de polifosfato como da área de tilacoides em CYRF-01.

- O presente estudo amplia a visão de trabalhos anteriores do Grupo o qual vem analisando diferentes parâmetros morfológicos e fisiológicos em resposta a estresses ambientais em microrganismos de ecossistemas aquáticos (GAMALIER, 2012; NOYMA, 2009; SILVA et al., 2014). Desta forma, este estudo reforça a importância da análise individual de fatores, como interações interespecíficas, que interferem diretamente na comunidade de cianobactérias. Em conjunto, nossos resultados demonstram que este tipo de interação induz alterações estruturais a nível celular nas espécies envolvidas. Tais alterações são refletidas em diferentes organelas citoplasmáticas, dentre estas CLs foram reconhecidos organelas dinâmicas em cianobactérias, capazes de responder à estímulos do meio. À semelhança CLs de células eucarióticas, sugere-se que CLs de cianobactérias desempenham outras funções além de reserva energética. Além disso, o presente trabalho contribui para o entendimento da organização estrutural de cianobactérias e para compreensão de mecanismos celulares, como secreção celular através de VMEs. O melhor entendimento das respostas celulares de cianobactérias é importante na compreensão da dinâmica da comunidade desses microrganismos e suas relações em ecossistemas aquáticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. G.; DUGGAN, P. S.; JACKSON, O. Cyanobacterial symbioses. In: (Ed.). **Ecology of Cyanobacteria II**: Springer, 2012. p.593-647. ISBN 9400738544.

AGUSTI, S. et al. Cell death in lake phytoplankton communities. **Freshwater Biol**, v. 51, n. 8, p. 1496-1506, 2006.

ALLEN, M. M. Cyanobacterial cell inclusions. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 1-25, 1984.

BARBESTI, S. et al. Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria. **Cytometry**, v. 40, n. 3, p. 214-218, 2000.

BERNEY, M. et al. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3283-3290, 2007.

BILLER, S. J. et al. Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems. **Science**, v. 343, n. 6167, p. 183-186, 2014.

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.

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, n. 1, p. 77-86, 1999.

BOUVY, M. et al. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, n. 1, p. 13-27, 2000.

BOZZA, P. T.; MELO, R. C.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 30-49, 2007.

BRANCO, C. W.; SENNA, P. A. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes**, p. 85-96, 1994.

BRASAEMLE, D. L. et al. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46835-46842, 2004.

BRASAEMLE, D. L. et al. The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1483, n. 2, p. 251-262, 2000.

CAIOLA, M. G.; PELLEGRINI, S. LYSIS OF MICROCYSTIS AERUGINOSA (KÜTZ.) BY BDELLOVIBRIO-LIKE BACTERIA1. **Journal of phycology**, v. 20, n. 4, p. 471-475, 1984.

CAPONE, D.; CARPENTER, E. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria: historical and global perspectives. **Bulletin de l'Institut océanographique**, p. 619-620, 1999.

CAPONE, D. G. Marine nitrogen fixation: what's the fuss? **Current opinion in microbiology**, v. 4, n. 3, p. 341-348, 2001.

CARMICHAEL, W. W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHABs". **Human and ecological risk assessment: An International Journal**, v. 7, n. 5, p. 1393-1407, 2001.

CARNEIRO, R. L.; PACHECO, A. B. F.; DE OLIVEIRA E AZEVEDO, S. M. F. Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) correlate with water hardness. **Marine drugs**, v. 11, n. 8, p. 2949-2963, 2013.

CASAMATTA, D. A. et al. MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF TEN POLAR AND NEAR-POLAR STRAINS WITHIN THE OSCILLATORIALES (CYANOBACTERIA) 1. **Journal of Phycology**, v. 41, n. 2, p. 421-438, 2005.

CHAPMAN, A. D.; SCHELSKE, C. L. RECENT APPEARANCE OF CYLINDROSPERMOPSIS (CYANOBACTERIUM) IN FIVE HYPEREUTROPHIC FLORIDA LAKES1. **Journal of Phycology**, v. 33, n. 2, p. 191-195, 1997.

CHAUHAN, S.; PANDEY, R.; SINGHAL, G. S. Ultraviolet-B Induced Changes in Ultrastructure and D1/D2 Proteins in Cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942. **Photosynthetica**, v. 35, n. 2, p. 161-167, 1998.

CHIARINI-GARCIA, H.; MELO, R. C. **Light microscopy: methods and protocols**. Humana Press, 2011. ISBN 1607619490.

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

DIAS, F. F. et al. The intriguing ultrastructure of lipid body organelles within activated macrophages. **Microscopy and Microanalysis**, v. 20, n. 03, p. 869-878, 2014.

DIGEL, M.; EHEHALT, R.; FÜLLEKRUG, J. Lipid droplets lighting up: insights from live microscopy. **FEBS letters**, v. 584, n. 11, p. 2168-2175, 2010.

DING, Y. et al. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets. **Journal of lipid research**, v. 53, n. 3, p. 399-411, 2012.

DOKULIL, M. T.; MAYER, J. Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis-Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes**, v. 83, p. 179-195, 1996.

DUFRESNE, A. et al. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p. 10020-10025, 2003.

DVORAK, A. et al. Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 759-769, 1992.

DVOŘÁK, P. et al. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 4, p. 739-757, 2015.

EDWARDS, M. R. et al. ULTRASTRUCTURE OF THE THERMOPHILIC BLUE-GREEN ALGA, *SYNECHOCOCCUS LIVIDUS* COPELAND1. **Journal of Phycology**, v. 4, n. 4, p. 283-298, 1968.

ELLIS, T. N.; KUEHN, M. J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 1, p. 81-94, 2010.

EVERSON, S. et al. Extreme differences in akinete, heterocyte and cylindrospermopsin concentrations with depth in a successive bloom involving *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju. **Harmful Algae**, v. 10, n. 3, p. 265-276, 2011.

FALCON, L. I. et al. ULTRASTRUCTURE OF UNICELLULAR N₂ FIXING CYANOBACTERIA FROM THE TROPICAL NORTH ATLANTIC AND SUBTROPICAL NORTH PACIFIC OCEANS1. **Journal of phycology**, v. 40, n. 6, p. 1074-1078, 2004.

FERRÃO-FILHO, A. D. S. et al. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 2, p. 479-489, 2009.

FIGUEREDO, C. C.; GIANI, A.; BIRD, D. F. DOES ALLELOPATHY CONTRIBUTE TO CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII (CYANOBACTERIA) BLOOM OCCURRENCE AND GEOGRAPHIC EXPANSION? 1. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 2, p. 256-265, 2007.

FISTAROL, G. O. et al. Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 791-798, 2004.

FLORES, F. G.; HERRERO, A. **The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution**. Horizon Scientific Press, 2008. ISBN 1904455158.

FREDRIKSSON, C.; BERGMAN, B. Ultrastructural characterisation of cells specialised for nitrogen fixation in a non-heterocystous cyanobacterium, *Trichodesmium* spp. **Protoplasma**, v. 197, n. 1-2, p. 76-85, 1997.

FREESE, H.; KARSTEN, U.; SCHUMANN, R. Bacterial abundance, activity, and viability in the eutrophic river Warnow, Northeast Germany. **Microbial ecology**, v. 51, n. 1, p. 117-127, 2006.

FREESE, 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.

FUJIMOTO, T. et al. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. **Histochemistry and cell biology**, v. 130, n. 2, p. 263-279, 2008.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 97-125, 2008.

GAMALIER, J. P. **Bactérias aquáticas cultiváveis sob efeito da radiação ultravioleta: avaliação da curva de crescimento, viabilidade celular e ultraestrutura**. 2012. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

GANTT, E.; CONTI, S. Ultrastructure of blue-green algae. **Journal of bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1486-1493, 1969.

GORHAM, P. et al. ISOLATION AND CULTURE OF TOXIC STRAINS OF ANABAENA FLOS-AQUAE(LYNGB.) DE BREB. 1964.

GREGOR, J.; MARŠÁLEK, B. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. **Water Research**, v. 38, n. 3, p. 517-522, 2004.

GROMOV, B.; GAVRILOVA, O.; KONOVALOV, E. ULTRASTRUCTURE OF CELLS IN CYANOBACTERIA OF THE GENUS CYANOTHECE. **MICROBIOLOGY**, v. 55, n. 5, p. 658-661, 1986.

GROSS, E. M. Allelopathy of aquatic autotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3-4, p. 313-339, 2003.

GUPTA, V. et al. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—prospects and challenges. **Algal research**, v. 2, n. 2, p. 79-97, 2013.

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.

HAMILTON, P. B. et al. The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprokaryote new to Canada. **Phycologia**, v. 44, n. 1, p. 17-25, 2005.

HAROLD, F.; BAARDA, J. Interaction of arsenate with phosphate-transport systems in wild-type and mutant *Streptococcus faecalis*. **Journal of bacteriology**, v. 91, n. 6, p. 2257-2262, 1966.

HAURAT, M. F.; ELHENAWY, W.; FELDMAN, M. F. Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. **Biological chemistry**, v. 396, n. 2, p. 95-109, 2015.

HEALEY, F. Phosphate. **The biology of cyanobacteria**, v. 19, p. 105-124, 1982.

HERKER, E.; OTT, M. Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 6, p. 241-248, 2011.

HOEFEL, D. et al. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. **Journal of microbiological methods**, v. 55, n. 3, p. 585-597, 2003.

HOICZYK, E.; HANSEL, A. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1191-1199, 2000.

HONG, Y. et al. Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 262-269, 2009.

HUSZAR, V.; SILVA, L. D. A estrutura da comunidade fitoplanctônica no Brasil: cinco décadas de estudos. **Limnotemas, São Carlos**, v. 2, 1999.

IKAWA, M.; HANEY, J. F.; SASNER, J. J. Inhibition of *Chlorella* growth by the lipids of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Hydrobiologia**, v. 331, n. 1-3, p. 167-170, 1996.

IMAMURA, M. et al. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 4, p. E775-E783, 2002.

JANG, M.-H.; HA, K.; TAKAMURA, N. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 727-733, 2007.

JENSEN, T. E. Cyanobacterial ultrastructure. **Ultrastructure of Microalgae**, v. 1, p. 7-51, 1993.

JOHNSON, T. J. et al. Testing a dual-fluorescence assay to monitor the viability of filamentous cyanobacteria. **Journal of microbiological methods**, v. 113, p. 57-64, 2015.

JOUX, F.; LEBARON, P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 12, p. 1523-1535, 2000.

KADURUGAMUWA, J. et al. S-Layered *Aneurinibacillus* and *Bacillus* spp. Are Susceptible to the Lytic Action of *Pseudomonas aeruginosa* Membrane Vesicles. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 9, p. 2306-2311, 1998.

KAISER, B. K. et al. Fatty aldehydes in cyanobacteria are a metabolically flexible precursor for a diversity of biofuel products. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58307, 2013.

KEATING, K. I. Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake. **Science**, v. 196, n. 4292, p. 885-887, 1977.

KIMMEL, A. R. et al. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 3, p. 468-471, 2010.

KOMÁREK, J.; VASLAVSKÁ, J. Thylakoid patterns in oscillatorial cyanophytes. **Archiv Hydrobiol Suppl/Algolog Studies**, v. 64, p. 267-270, 01/01 1991.

KOOPMAN, R.; SCHAART, G.; HESSELINK, M. K. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. **Histochemistry and cell biology**, v. 116, n. 1, p. 63-68, 2001.

KROMKAMP, J. Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 21, n. 3, p. 457-465, 1987.

KULP, A.; KUEHN, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annual review of microbiology**, v. 64, p. 163, 2010.

KÜTZING, F. T. **Phycologia Generalis: oder, Anatomie, physiologie und systemkunde der tange**. FA Brockhaus, 1843.

LAWRY, N. H.; JENSEN, T. E. Deposition of condensed phosphate as an effect of varying sulfur deficiency in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. (*Anacystis nidulans*). **Archives of Microbiology**, v. 120, n. 1, p. 1-7, 1979.

LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge University Press, 2008. ISBN 1139469878.

LEFLAIVE, J.; TEN-HAGE, L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater Biology**, v. 52, n. 2, p. 199-214, 2007.

LEGRAND, C. et al. Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. **Phycologia**, v. 42, n. 4, p. 406-419, 2003.

LEWIS JR, W. M. Evolutionary interpretations of allelochemical interactions in phytoplankton algae. **American Naturalist**, p. 184-194, 1986.

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

LIBERTON, M. et al. Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. **Protoplasma**, v. 227, n. 2-4, p. 129-138, 2006.

LIU, S. et al. Study on the Enhancement of Readily Biodegradable Organic Matter in Wastewater by Iron-carbon Micro-electrolysis Process. **Science Technology and Engineering**, v. 29, p. 059, 2013.

MA, H. et al. Growth inhibitory effect of *Microcystis* on *Aphanizomenon flos-aquae* isolated from cyanobacteria bloom in Lake Dianchi, China. **Harmful Algae**, v. 42, p. 43-51, 2015.

MAGALHAES, V. F.; AZEVEDO, S. Ecological implications of hepatotoxic *microcystis aeruginosa* in the Jacarepaguá Lagoon, Brazil. **Harmful Algae. Junta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco**, p. 26-8, 1998.

MARINHO, M. M.; SOUZA, M. B. G.; LÜRLING, M. Light and phosphate competition between *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* is strain dependent. **Microb Ecol**, v. 66, n. 3, p. 479-488, 2013.

MASHBURN, L. M.; WHITELEY, M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 422-425, 2005.

- MCBROOM, A. J.; KUEHN, M. J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. **Molecular microbiology**, v. 63, n. 2, p. 545-558, 2007.
- MEISSNER, S.; STEINHAUSER, D.; DITTMANN, E. Metabolomic analysis indicates a pivotal role of the hepatotoxin microcystin in high light adaptation of *Microcystis*. **Environmental microbiology**, 2014.
- MELLO, M. M. et al. Growth inhibition and colony formation in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of plankton research**, v. 34, n. 11, p. 987-994, 2012.
- MELO, R. et al. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. **Inflammation Research**, v. 55, n. 8, p. 342-348, 2006.
- MELO, R. C. et al. Lipid Bodies in Inflammatory Cells Structure, Function, and Current Imaging Techniques. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011.
- MELO, R. C.; DVORAK, A. M. Lipid body–phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? **PLoS pathogens**, v. 8, n. 7, p. e1002729, 2012.
- MELO, R. C. et al. Histological approaches for high-quality imaging of zooplanktonic organisms. **Micron**, v. 38, n. 7, p. 714-721, 2007.
- MOHAMED, Z. A. Allelopathic activity of *Spirogyra* sp.: stimulating bloom formation and toxin production by *Oscillatoria agardhii* in some irrigation canals, Egypt. **Journal of plankton research**, v. 24, n. 2, p. 137-141, 2002.
- MOLISCH, H. The influence of one plant on another. **Gustav Fischer, Jena**, 1937.
- MULLINEAUX, C. W. Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1837, n. 4, p. 503-11, Apr 2014.
- MUR, R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. . CYANOBACTERIA IN THE ENVIRONMENT. 1999.
- MURPHY, D. J. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 541-585, 2012.

NGUYEN, L. T. T. et al. *Annamia toxicagen. et sp. nov.* (Cyanobacteria), a freshwater cyanobacterium from Vietnam that produces microcystins: ultrastructure, toxicity and molecular phylogenetics. **Phycologia**, v. 52, n. 1, p. 25-36, 2013.

NOVICS, V. I. et al. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. **Freshwater biology**, v. 43, p. 257-275, 2000.

NOYMA, N. **Avaliação da ultraestrutura e morte celular em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cianobacteria) sob efeito da radiação.**

ultravioleta. 2009. PGECOL, UFJF

PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **ARCHIV FÜR HYDROBIOLOGIE SUPPLEMENTBAND MONOGRAPHISCHE BEITRAGE**, v. 107, n. 4, p. 563-593, 1997.

PALIŃSKA, K.; KRUMBEIN, W.; SCHLEMMINGER, U. Ultramorphological studies on *Spirulina* sp. **Botanica marina**, v. 41, n. 1-6, p. 349-356, 1998.

PERAMUNA, A.; SUMMERS, M. L. Composition and occurrence of lipid droplets in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Archives of microbiology**, v. 196, n. 12, p. 881-890, 2014.

PETTERSSON, A.; HÄLLBOM, L.; BERGMAN, B. Aluminum effects on uptake and metabolism of phosphorus by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. **Plant physiology**, v. 86, n. 1, p. 112-116, 1988.

POL, A.; GROSS, S. P.; PARTON, R. G. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. **The Journal of cell biology**, v. 204, n. 5, p. 635-646, 2014.

RAJAGOPAL, S. et al. Ultraviolet-B Effects on *Spirulina platensis* Cells: Modification of Chromophore-Protein Interaction and Energy Transfer Characteristics of Phycobilisomes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 249, n. 1, p. 172-177, 1998.

REYNOLDS, C. S. Cyanobacterial water-blooms. **Advances in botanical research**, v. 13, p. 67-143, 1987.

RZYMSKI, P. et al. Interspecific allelopathy in cyanobacteria: cylindrospermopsin and *Cylindrospermopsis raciborskii* effect on the growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 35, p. 1-8, 2014.

SANT'ANNA, C. L. et al. **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras Rio de Janeiro**. 2006.

SANTOS, P. V. D. **Interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*: implicações no crescimento de culturas e na produção de microcistinas**. 2009. Universidade de São Paulo

SCIUTO, K.; MORO, I. Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 4, p. 711-738, 2015.

SEO, E. Y.; AHN, T. S.; ZO, Y. G. Agreement, precision, and accuracy of epifluorescence microscopy methods for enumeration of total bacterial numbers. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 6, p. 1981-91, Mar 2010.

SHAFIK, H. M. et al. Some special morphological features of *Cylindrospermopsis raciborskii* in batch and continuous cultures. **Hydrobiologia**, v. 506, n. 1-3, p. 163-167, 2003.

SHI, L.; CARMICHAEL, W. W.; MILLER, I. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. **Archives of microbiology**, v. 163, n. 1, p. 7-15, 1995.

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

SINHA, R. et al. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones--is climate change responsible? **Water Res**, v. 46, n. 5, p. 1408-19, Apr 1 2012.

SINHA, R. et al. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones--is climate change responsible? **water research**, v. 46, n. 5, p. 1408-1419, 2012.

SINKKONEN, A. Ecological relationships and allelopathy. In: (Ed.). **Allelopathy**: Springer, 2006. p.373-393. ISBN 1402042795.

SIX, C. et al. UV-induced phycobilisome dismantling in the marine picocyanobacterium *Synechococcus* sp WH8102. **Photosynth Res**, v. 92, n. 1, p. 75-86, Apr 2007.

SOARES, M. C. S. et al. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 57, n. 2, p. 137, 2009.

SOMMER, U. Comparison between steady state and non-steady state competition: experiments with natural phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 30, n. 2, p. 335-346, 1985.

STEVENS, S.; NIERZWICKI-BAUER, S.; BALKWILL, D. Effect of nitrogen starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. **Journal of bacteriology**, v. 161, n. 3, p. 1215-1218, 1985.

SUROSZ, W.; PALINSKA, K. Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 48, n. 1, p. 40-48, 2004.

SUZUKI, M. et al. Lipid droplets: size matters. **Journal of electron microscopy**, v. 60, n. suppl 1, p. S101-S116, 2011.

TAUCHI-SATO, K. et al. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44507-44512, 2002.

TAVARES, L. H. S.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. RiMa, 2003. ISBN 8586552178.

TSUKAMOTO, S. et al. Microcystilide A: a novel cell-differentiation-promoting depsipeptide from *Microcystis aeruginosa* NO-15-1840. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 23, p. 11046-11047, 1993.

VAHTERA, E.; LAAMANEN, M.; RINTALA, J. Use of different phosphorus sources by the bloom-forming cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae* and *Nodularia spumigena*. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 46, n. 3, p. 225-237, 2007.

VALDOR, R.; ABOAL, M. Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 769-779, 2007.

VALÉRIO, E. et al. Seasonal variation of phytoplankton and cyanobacteria composition and associated microcystins in six Portuguese freshwater reservoirs. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 2008. Cambridge Univ Press. p.189-196.

VAN DE MEENE, A. M. et al. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Archives of Microbiology**, v. 184, n. 5, p. 259-270, 2006.

VASSILAKAKI, M.; PFLUGMACHER, S. Oxidative stress response of *Synechocystis* sp.(PCC 6803) due to exposure to microcystin-LR and cell-free cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR. **Journal of applied phycology**, v. 20, n. 3, p. 219-225, 2008.

VISSER, P. M. et al. The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. In: (Ed.). **Harmful Cyanobacteria**: Springer, 2005. p.109-142. ISBN 1402030096.

WÄLTERMANN, M.; STEINBÜCHEL, A. Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 11, p. 3607-3619, 2005.

WALTHER, T. C.; FARESE JR, R. V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. **Annual review of biochemistry**, v. 81, p. 687, 2012.

WAN, H.-C. et al. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 1, p. 167-178, 2007.

WATANABE, M. F. et al. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). **Journal of applied phycology**, v. 1, n. 2, p. 161-165, 1989.

WELLER, P. et al. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. **The American journal of pathology**, v. 138, n. 1, p. 141, 1991.

WELTE, M. A. Proteins under new management: lipid droplets deliver. **Trends in cell biology**, v. 17, n. 8, p. 363-369, 2007.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. Introduction to the cyanobacteria. In: (Ed.). **Ecology of Cyanobacteria II**: Springer, 2012. p.1-13. ISBN 9400738544.

WILLIS, R. The historical bases of the concept of allelopathy. **Journal of the History of Biology**, v. 18, n. 1, p. 71-102, 1985.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

WOLK, C. P. Physiology and cytological chemistry blue-green algae. **Bacteriological reviews**, v. 37, n. 1, p. 32, 1973.

WU, Y. et al. Allelopathic control of cyanobacterial blooms by periphyton biofilms. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 3, p. 604-615, 2011.

WU, Z.; SHI, J.; LI, R. Comparative studies on photosynthesis and phosphate metabolism of *Cylindrospermopsis raciborskii* with *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenon flos-aquae*. **Harmful Algae**, v. 8, n. 6, p. 910-915, 2009.

ZAMYADI, A. et al. Fate of toxic cyanobacterial genera from natural bloom events during ozonation. **Water research**, v. 73, p. 204-215, 2015.

ZANCHETT, G.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. **Toxins**, v. 5, n. 10, p. 1896-1917, 2013.

ZHU, T.; XU, X. Efficacy of a dual fluorescence method in detecting the viability of overwintering cyanobacteria. **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 3, p. 174-180, 2013.

ANEXO

Durante o desenvolvimento do trabalho, com participação na autoria, foi publicado o artigo intitulado: “The Intriguing Ultrastructure of Lipid Body Organelles Within Activated Macrophages” na revista *Microscopy and Microanalysis*, cuja primeira página se encontra dentro do escopo do presente estudo.

The Intriguing Ultrastructure of Lipid Body Organelles Within Activated Macrophages

Felipe F. Dias,¹ Victor C. Zarantonello,¹ Gleydes G. Parreira,² Hélio Chiarini-Garcia,² and
Rossana C. N. Melo^{1,*}

¹Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

²Laboratory of Structural Biology and Reproduction, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Abstract: Macrophages are widely distributed immune system cells with essential functions in tissue homeostasis, apoptotic cell clearance, and first defense in infections. A distinguishing feature of activated macrophages participating in different situations such as inflammatory and metabolic diseases is the presence of increased numbers of lipid-rich organelles, termed lipid bodies (LBs) or lipid droplets, in their cytoplasm. LBs are considered structural markers of activated macrophages and are involved in different functions such as lipid metabolism, intracellular trafficking, and synthesis of inflammatory mediators. In this review, we revisit the distinct morphology of LB organelles actively formed within macrophages in response to infections and cell clearance, taking into account new insights provided by ultrastructural studies. We also discuss the LB interactions within macrophages, revealed by transmission electron microscopy, with a focus on the remarkable LB-phagosome association and discuss potential links between structural aspects and function.

Key words: lipid droplets, infectious diseases, innate immunity, host–pathogen interactions, ultrastructure, macrophages, inflammation, cell activation, lipids, lipid mediators

INTRODUCTION

Lipid bodies (LBs), frequently termed lipid droplets, are complex organelles of all cell types, including bacteria. These organelles, largely associated with lipid storage in the past, are now recognized as dynamic and functionally active organelles, involved in a variety of functions such as lipid metabolism, trafficking, and signaling (reviewed in Walther & Farese, 2009; Murphy, 2012).

During the last decade, the study of LBs has attracted considerable attention owing to their link with human diseases such as obesity, infectious diseases, and cancer (reviewed in Bozza & Viola, 2010; Melo et al., 2011; Murphy, 2012). These situations induce consistent formation of LBs within different cell types. For example, in cells from the immune system, especially macrophages, eosinophils, and neutrophils, LBs are rapidly formed in response to a range of inflammatory diseases and act as intracellular sites for the synthesis of arachidonic acid (AA)-derived inflammatory lipid mediators (eicosanoids) (Melo et al., 2011). Enzymes involved in the synthesis of eicosanoids as well as eicosanoids themselves are found in LBs formed in the cytoplasm of these cells (Melo et al., 2011).

Proteomic studies have revealed a detailed list of proteins within LBs from varied cells (Bartz et al., 2007; Hodges & Wu, 2010; Yang et al., 2012). Interestingly, several of the proteins found within LBs are predicted to span a membrane

two or more times (Goodman, 2009). This means that LBs have a much more complex structure and are not solely a mass of lipid esters associated with lipid storage as documented in the past.

In light of these findings, more attention has been brought to LB structure and the ultrastructural aspects of this organelle have been studied in more detail (Melo et al., 2006, 2013; Cheng et al., 2009). Indeed, LBs have a distinctive and intriguing morphology. LBs have a core composed of lipids mainly triacylglycerols and sterol esters and proteins surrounded by a phospholipid hemi-membrane with associated proteins (reviewed in Bozza et al., 2007; Melo et al., 2011). Therefore, LBs do not show a delimiting true membrane and therefore differ from all other cytoplasmic membranous organelles and vesicles that have an aqueous content surrounded by a phospholipid bilayer membrane (Fig. 1). This unique feature of LBs—lack of peripheral membrane unit—facilitates the identification of these organelles by transmission electron microscopy (TEM) compared with other intracellular membranous organelles (Melo et al., 2006). Therefore, TEM has been an important tool to study LB structure without the need of any additional marker.

TEM findings from our group and others have demonstrated that LBs occupy large portions of the macrophage cytoplasm in response to different diseases such as infections with parasites and mycobacteria, and show a remarkable interaction of newly formed LBs with phagosomes (reviewed in Melo et al., 2011; Melo & Dvorak, 2012). Moreover, we have been using TEM to study the ultrastructure of LBs formed within activated macrophages participating in other