

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

Natália Pessoa Noyma

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

JUIZ DE FORA
2009

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

Natália Pessoa Noyma

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

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 Corrêa Netto de Melo

Co-Orientador: Prof. Dr.Fábio Roland

JUIZ DE FORA

2009

Noyma, Natália Pessoa.

Avaliação da ultraestrutura e morte celular em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya e Subba Raju (Cianobacteria) sob efeito da radiação ultravioleta / Natália Pessoa Noyma. – 2009.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ecologia)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Radiação ultravioleta. 2. *Cylindrospermopsis*. 3. Morte celular. I.
Título.

CDU 66.085.3

NATÁLIA PESSOA NOYMA

AVALIAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA E MORTE CELULAR EM *Cylindrospermopsis raciborskii* (WOLOSZYNSKA) SEENAYYA & SUBBA RAJU (CYANOBACTERIA) SOB EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

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

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof. André Megali Amado, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Hélio Chiarini-Garcia, Dr.
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Fábio Roland, Dr. – Co-orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a Rossana Correa Netto de Melo., Dr^a. - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

A toda minha família: seja de
sangue, seja de coração.

AGRADECIMENTOS

À minha família por sempre apoiar as minhas decisões, mesmo que muitas vezes as mesmas tenham me tornado distante e por me incentivar a cada passo deste percurso.

Aos meus orientadores. Obrigada, Fábio, por me sempre me apresentar a Ecologia e por me ensinar que a ciência transcende barreiras. Obrigada, Rossana, por me ensinar a ter um diferente olhar e por aceitar o desafio dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia pelo processamento e a ajuda nas análises de microscopia eletrônica. Obrigada por ser sempre atencioso.

A Prof. Dr. Patrícia Bozza que, por intermédio da Dra. Heloísa D'Ávila, proveu parte do marcador celular utilizado nesse trabalho.

Aos componentes da banca, Prof. Dr. André Amado e Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia pelas contribuições para melhoria deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Aquática (Anderson, Caíque, Felipe, Guilherme A., Guilherme D., Lúcia, Luciana, Marcela, Mariana, Michele, Nathan, Raquel, Rafael M., Rafael P.) pela companhia, pelas conversas e pelas ajudas. Ao Gladson pela construção do compartimento de luz e pelo apoio técnico. À Simone pela ajuda nos experimentos e por sempre estar disposta a me ajudar. À Dra. Maria Carolina Soares pelas conversas científicas e por sempre tirar minhas dúvidas.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Celular por me “adotar” na equipe e incluir-me neste mundo novo.

A Thabata, minha “irmã mais nova”, pela imensa ajuda na padronização da técnica de citocentrifugação e pelas discussões produtivas das técnicas utilizadas nessa dissertação.

Às minhas amigas “extra-ecologia” (Luiza, Priscila, Márcia e Deila) as quais sempre me apoiaram e me incentivaram ao longo deste período. Amo vocês!

Ao Diego, pelo apoio, pela paciência, pela compreensão e por, acima de tudo pelo carinho e amor recebido.

RESUMO

A radiação solar é essencial para a vida na Terra, fornecendo energia para a fotossíntese e calor. Do total da radiação que tinge o planeta, 9% é representada pela radiação ultravioleta (UV). Estudos com grupos de cianobactérias mostram efeitos negativos de radiação UV em processos fisiológicos, como crescimento e sobrevivência e alterações de enzimas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio e fixação de CO₂. *Cylindrospermopsis raciborskii* é uma cianobactéria filamentosa fixadora de nitrogênio que vem se tornando uma das espécies de cianobactérias de maior interesse de pesquisadores devido a sua potencial toxicidade e sua elevada adaptabilidade ecofisiológica. Neste trabalho, investigou-se o efeito da radiação UV-A, UV-B e UV (A+B) na densidade, viabilidade celular e ocorrência de alterações morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão. Foram usadas intensidades naturais sobre a cepa de *C. raciborskii* no período de 6 horas de tratamento. Os tratamentos UV-A e UV (A+B) apresentaram efeitos negativos significativos na densidade e integridade de membrana (99,3 e 95% de células mortas, respectivamente), enquanto UV-B não apresentou diferença significativa na densidade, mas induziu alteração de integridade da membrana em 57% das células no final do tratamento. Análises ultraestruturais demonstraram modificações morfológicas em todos os tratamentos caracterizadas principalmente por redução da proporção de tilacóides e estruturas de armazenamento de pigmentos acessórios. Nossos resultados demonstram a indução de morte celular significativa em cepa de *C. raciborskii* pelos tratamentos UV-A e UV (A+B). Entretanto, o tratamento UV-B parece ser menos letal para esta cepa na intensidade usada. O entendimento de processos de morte celular em populações fitoplactônicas induzida por radiação UV (A+B) abre novas perspectivas sobre a influência deste tipo de radiação em

ecossistemas aquáticos e suas conseqüências na persistência de espécies, fluxo energético e ciclos biogeoquímicos.

Palavras-chave: Radiação ultravioleta. *Cylindrospermopsis raciborskii*. Morte celular.

Alterações ultraestruturais.

ABSTRACT

Solar radiation is essential for life on Earth, providing energy for photosynthesis and heat. The total radiation that reaches the Earth surface, 9% is represented by the ultraviolet radiation (UV). Studies with cyanobacterial groups show negative effects of UV radiation on physiological processes such as growth, survival and enzymes of nitrogen metabolism and CO₂ fixation. *Cylindrospermopsis raciborskii* is a filamentous nitrogen fixing cyanobacteria that has become one of the species of cyanobacteria of interest to researchers because of its potential toxicity and its high ecophysiological adaptability. In this work, we investigated the effect of UV-A, UV-B and UV (A + B) on the density, cell viability and occurrence of morphological changes by transmission electron microscopy. Natural intensities were used on strain of *C. raciborskii* in a period of 6 hours of treatment. The treatments UV-A and UV had significant negative effects on the density and integrity of membrane (99.3 and 95% of dead cells, respectively), while UV-B showed no significant difference in density, but induced alteration of membrane integrity in 57% of the cells at the end of treatment. Ultrastructural analysis showed morphological changes in all treatments characterized mainly by reducing the proportion of thylakoid structures and pigments accessories storage. Our results demonstrate the induction of cell death in strains of *C. raciborskii* treatments by UV-A and UV. However, the UV-B treatment seems to be less lethal to this strain in the intensity used. The understanding of processes of cell death in phytoplanktonic populations induced by UV radiation opens new perspectives on the influence of such radiation on aquatic ecosystems and its consequences on the persistence of species, energy flow and biogeochemical cycles.

Keywords: Ultraviolet Radiation. *Cylindrospermopsis raciborskii*. Cell Dead.
Ultrastructural changes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Micrografia 1: Diferentes tipos de morfologia encontrados no grupo das cianobactérias.....	15
Esquema 1: Desenho esquemático das principais estruturas encontradas em cianobactérias.....	16
Fotografia 1 Foto representativa dos experimentos com radiação ultravioleta mostrando a disposição da lâmpada sobre os frascos com cultura de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	24
Desenho 1: Desenho experimental.....	26
Gráfico 1: Variação das intensidades da radiação UV (UV-A e UV-B) no período entre 07 e 17 horas em um dia sem nuvens.....	33
Gráfico 2: Densidade celular (células. ml ⁻¹) ao longo do tempo nos tratamentos (UV-A, UV-B e UV (A+B)).....	34
Gráfico 3: Taxas de mortalidade de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> baseadas na densidade em três tratamentos com radiação ultravioleta.....	35
Micrografia 2: Comparação dos dois métodos de preparação de lâminas para visualização de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	36
Micrografia 3: Micrografias comparativas dos métodos de preparação de lâminas para visualização de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> com o uso de marcador fluorescente.....	36
Micrografia 4: Micrografia representativa da dupla marcação usando-se o kit LIVE/DEAD <i>BacLight</i>	37
Micrografia 5: Micrografia de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> mostrando células coradas com diferentes marcadores em um mesmo filamento.....	38
Gráfico 4: Porcentagem de células com membrana intacta (viáveis) e membrana injuriada (não viáveis) nos tratamentos UV-A, UV-B e UV (A+B).....	39
Gráfico 5 Porcentagem de células viáveis no final dos tratamentos UV-A, UV-B e UV (A+B).....	40
Eletromicrografia 1: Eletromicrografia da célula de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	44
Eletromicrografia 2: Eletromicrografias de cortes transversais de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	45
Eletromicrografia 3: Corte longitudinal de um filamento contendo quatro células.....	46
Eletromicrografia 4: Eletromicrografia de corte transversal evidenciando a disposição de corpos poliédricos nas células.....	47
Eletromicrografia 5: Alterações da área celular ocupada por tilacóides.....	48
Eletromicrografia 6: Eletromicrografia de cortes longitudinais evidenciando a perda da integridade da membrana e redução dos tilacóides.....	49
Eletromicrografia 7: Eletromicrografia de cortes transversais indicando desestruturação de grânulo de fosfato.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.2 Efeito de UV no fitoplâncton	13
1.3 Cianobactérias.....	14
1.3.1 Aspectos gerais.....	14
1.3.2 Ultraestrutura.....	15
1.3.3 Ecologia	17
1.4 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	18
1.6 Mortalidade fitoplanctônica.....	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivos Gerais.....	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Cultura Estoque.....	23
3.2 Experimentos com radiação ultravioleta.....	23
3.2.1 Lâmpadas.....	23
3.2.2 Desenho Experimental.....	25
3.3 Análise da densidade celular	26
3.4 Taxa de mortalidade.....	27
3.5 Preparação de citocentrifugados.....	27
3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	29
3.7.1 Preparação de amostras para MET.....	29
3.7.2 Processamento das amostras para MET.....	30
3.8 Captura e análise de imagens	30
3.9 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Luz ambiente	32
4.2 Densidade e taxa de mortalidade.....	33
4.3 Comparação da distribuição de cianobactérias utilizando-se citocentrifugação e filtração por filtro de membrana.....	36
4.4 Ultraestrutura.....	41
4.4.1 Controle.....	41
4.4.2 Tratamentos.....	43
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61

1. Introdução

1.1 Considerações Gerais

A radiação solar é essencial para a vida na Terra, fornecendo energia para a fotossíntese e calor. Cerca de metade desta energia é emitida como luz visível e o restante no comprimento do infravermelho e radiação ultravioleta. A pequena fração do ultravioleta que corresponde a aproximadamente 9% da radiação total que atinge a Terra (ANDERSON 1981) é dividida em ultravioleta C (190-280 nm), ultravioleta B (280-315 nm) e ultravioleta A (315-400nm). Embora a radiação UV-C seja totalmente absorvida pela atmosfera, a radiação UV-B é apenas parcialmente absorvida pela camada de ozônio da estratosfera (cerca de 20 a 40 km acima da superfície terrestre) enquanto que a radiação UV-A é, praticamente, inalterada pela mesma.

O ozônio (O_3) é um gás naturalmente presente na estratosfera e é altamente reativo. Este gás não é uniformemente distribuído ao longo do globo e, em geral, as concentrações são mais elevadas em médias e altas latitudes e, mais baixas, próximas ao equador (WMO 2003). A diferença é causada por ventos estratosféricos e pela produção química e destruição natural do ozônio.

Ações antrópicas durante as duas últimas décadas vêm contribuindo para a destruição da camada de ozônio. O maior fator responsável pela destruição são as emissões de clorofluorcarbonetos (CFC's). Estes gases sofrem fotólise quando chegam à estratosfera e há uma reação catalítica entre os átomos de cloro liberados com os átomos de oxigênio. Apesar de esforços internacionais serem feitos para que haja a diminuição da perda da camada de ozônio, níveis encontrados

antes da década de 80 ainda não foram recuperados (WEATHERHEAD e ANDERSEN 2006)

A redução da concentração de ozônio na estratosfera tem como consequência o aumento da incidência da radiação UV-B na superfície terrestre (CRUTZEN 1992, KERR e MCELROY 1993, MADRONICH 1992). Este tipo de radiação solar possui um alto efeito prejudicial em produtores primários terrestres e aquáticos, afetando, principalmente a produção primária e o crescimento destes organismos (DAY e NEALE 2002).

1.2 Efeito de UV no fitoplâncton

O fitoplâncton é constituído por algas microscópicas que flutuam livremente nas águas. É o elo primário das cadeias alimentares dos sistemas aquáticos, já que são organismos fotossintetizantes. A comunidade fitoplanctônica é composta por vários grupos de algas eucarióticas e um grupo de organismos fotossintéticos procarióticos, as cianobactérias.

A radiação ultravioleta é prejudicial à comunidade aquática, tendo diferentes efeitos sobre a mesma. No fitoplâncton, esta radiação é prejudicial ao crescimento, à reprodução e à enzimas e proteínas ligadas ao aparato fotossintético, como por exemplo, enzimas fotossintéticas que captam energia e os pigmentos fotossintéticos (HERRMANN, *et al.* 1996, VASSILIEV, *et al.* 1994). Além disso, o aumento da radiação UV-B pode alterar a estrutura e a função de cadeias tróficas e afetar ciclos biogeoquímicos (RECH, *et al.* 2005).

Estudos com grupos de cianobactérias mostram efeitos negativos de UV-B no crescimento, sobrevivência, pigmentação, motilidade, bem como nas enzimas do

metabolismo de nitrogênio e fixação de gás carbônico (CO₂) (DONKOR e HADER 1997, DONKOR e HADER 1996). Um grande número de cianobactérias desenvolveu estratégias adaptativas contra os excessivos efeitos negativos, como a capacidade de regulação da profundidade na coluna d'água e síntese de pigmentos protetores (micosporinas, por exemplo) (HADER, *et al.* 1998).

1.3 Cianobactérias

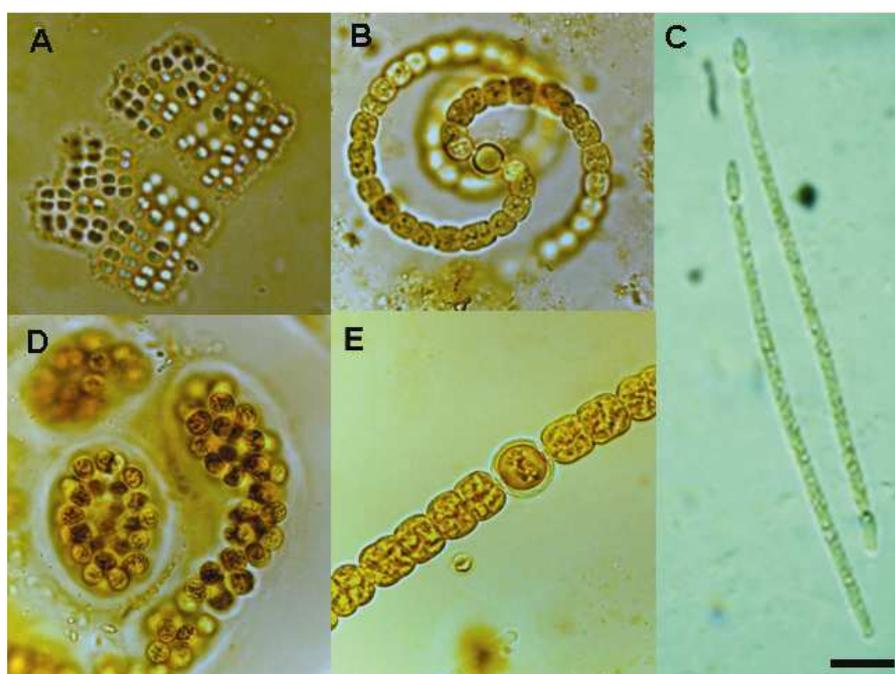
1.3.1 Aspectos gerais

Cianobactérias compõe um grupo de microorganismos uni ou multicelulares, procariontes, que possuem clorofila *a* e realizam fotossíntese através dos fotossistemas I e II (MUR, *et al.* 1999).

A morfologia de cianobactérias é variada. Observações sob microscopia de luz mostram que o talo pode ser unicelular, colonial ou filamentoso (Micrografia 1). Os indivíduos unicelulares podem ter formas muito diversas, desde arredondadas, oblongas e elípticas, até cilíndrico-arredondadas, fusiformes e piriformes. As células podem apresentar ou não envoltório mucilaginoso (SANT'ANNA, *et al.* 2006).

As colônias podem ser formadas por poucas células (2 a16) ou centenas delas; podendo apresentar diferentes morfologias. Os talos filamentosos podem ser uni ou multicelulares, apresentar ou não bainha mucilaginosa e podem ser ramificados ou simples. O termo tricoma é utilizado apenas para o conjunto de células dispostas linearmente e filamento para o conjunto de bainha mucilaginosa mais o tricoma (SANT'ANNA, *et al.* 2006).

Os tricomas podem apresentar apenas células vegetativas ou obrigatoriamente células modificadas (heterocito e acineto). Estas células modificadas são de extrema importância ecológica. Os heterocitos são células de parede fina e protoplasma hialino, capazes de fixar nitrogênio. Os acinetos são células grandes, igualmente de parede fina, mas contendo de reserva em seu protoplasma o que permite a sobrevivência da espécie sob condições desfavoráveis (SANT'ANNA, *et al.* 2006).

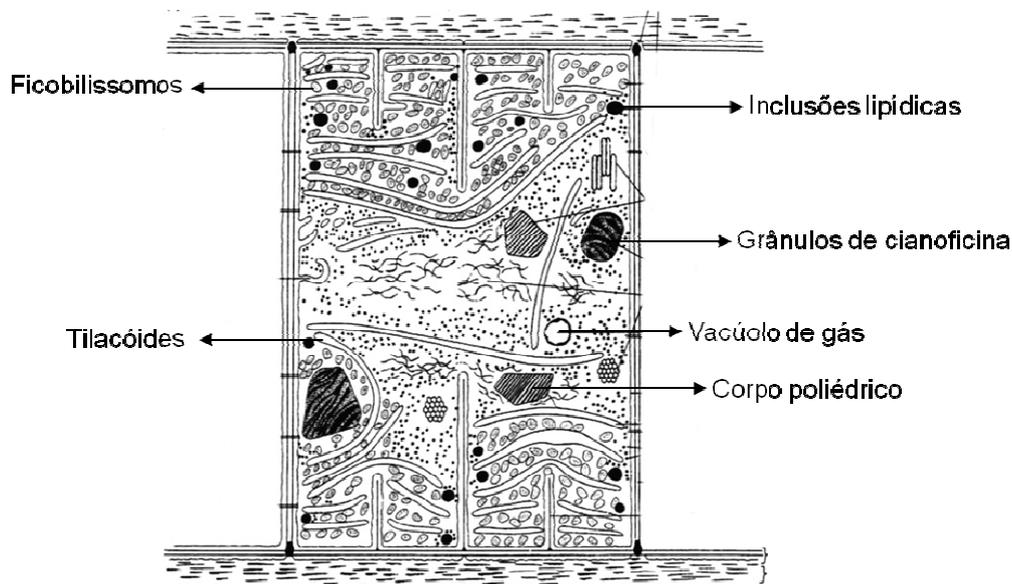


Micrografia 1: Diferentes tipos de morfologia encontrados no grupo das cianobactérias. Em (A e D) cianobactérias coloniais e em (B, C e E), filamentosas. Barra= 10 μm . Fonte: Simone J. Cradoso e Maria Carolina S. Soares.

A ultraestrutura de cianobactéria é pouco descrita na literatura. Trabalhos focando a ultraestrutura de cianobactérias são encontrados a partir da década de 60 (GANTT e CONTI 1969).

O envoltório celular das cianobactérias é típico de bactérias Gram-positivas, apresentado três camadas distintas: membrana plasmática interna, parede celular e membrana externa. Como toda célula procariota, caracteriza-se pela ausência de

plastos, que são organelas contendo um envoltório, formadas por duas membranas unitárias contendo internamente uma matriz (estroma) e que estão presentes nas demais células vegetais. Os pigmentos fotossintéticos e os demais componentes celulares estão dispersos no citoplasma. São encontradas estruturas de reserva, como grânulos de cianoficina que possuem a função de reserva de nitrogênio; grânulos de glicogênio, os quais armazenam diretamente os produtos da fotossíntese; inclusões de lipídio e grânulos de polifosfato (Esquema 1). Há outras estruturas de freqüente ocorrência, tais como ficobilissomos (reserva de pigmentos acessórios) associados aos tilacóides, corpos poliédricos que participam da fixação de carbono atmosférico e ribossomos 70S típico de células procariontes. Estruturas como os aerótopos são encontradas apenas em alguns grupos de cianobactérias e tem como função a flutuação.



Esquema 1: Desenho esquemático das principais estruturas encontradas em cianobactérias.

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 e BERGMAN 1997, GROMOV, *et al.* 1986, JENSEN 1993, PALINSKA, *et al.* 1998).

Apesar da grande variedade ultraestrutural documentada para o grupo de cianobactérias, não foram encontrados, na literatura, estudos ultraestruturais envolvendo cepa de *C. raciborskii*.

1.3.3 Ecologia

A diversificação dos usos múltiplos, bem como o despejo de resíduos líquidos e sólidos em rios, lagos, represas têm contribuído para a contínua perda de qualidade da água nesses ambientes. Tal processo, denominado eutrofização, pode ocorrer naturalmente, indicando um envelhecimento natural do sistema, no qual esses ecossistemas passam de uma condição oligotrófica (concentração baixa de nutrientes) para uma condição eutrófica (elevada concentração de nutriente) ou através da ação antrópica. Neste caso, este processo está associado ao aumento acelerado na concentração de nutrientes (nitrogênio e fósforo, principalmente), propiciando um crescimento excessivo e rápido dos organismos aquáticos fotossintetizantes (fitoplâncton e macrófitas).

O aumento da eutrofização leva, geralmente, a uma perda da diversidade e ao crescimento intenso de algumas algas planctônicas, formando o que é conhecido como florações. Dentre estas algas, destaca-se o grupo das cianobactérias. É muito freqüente o registro da dominância desse grupo em reservatórios e lagoas costeiras brasileiras (HUSZAR 1999).

A ocorrência de cianobactérias em ecossistemas aquáticos está associada a uma variedade de fatores, tais como: reduzida turbulência (REYNOLDS 1984), baixa intensidade luminosa (SMITH, V. H., 1986, ZEVENBOOM, *et al.*, 1980), elevadas temperaturas (SHAPIRO 1990), baixa concentração de CO₂ e elevado pH (CARACO e MILLER, 1998, KING, 1970, SHAPIRO, 1990). A alta afinidade por nutrientes, especialmente nitrogênio (BLOMQUIST, *et al.* 1994, SMITH 1983) e estocagem de fósforo (PETTERSON, *et al.* 1993) são importantes fatores determinantes para a ocorrência e formação de florações de cianobactérias.

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. Tais alterações levam a uma diminuição da qualidade da água, bem como problemas associados à saúde humana. Alguns grupos de cianobactérias produzem metabólitos secundários tóxicos (cianotoxinas) cuja função ecológica ainda não está clara apesar de alguns destes metabólitos apresentarem efeitos na biota (CHORUS e BARTRAM 1999).

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 2000, MAGALHÃES e AZEVEDO 1998).

1.4 *Cylindrospermopsis raciborskii*

Cylindrospermopsis raciborskii Seenayya et Subba Raju (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 heterocito terminal em uma ou nas duas extremidades do filamento, células vegetativas cilíndricas e acinetos oblongos-ovais (SHAFIK, *et al.* 2003).

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 e SENNA 1994, CHAPMAN e SCHELSKE 1997, DOKULIL e MAYER 1996). Embora tenha sido descrita como uma espécie tropical, sua ocorrência tem sido também relatada em ambientes de regiões subtropical e temperada (PADISÁK, 1997).

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.

C. raciborskii vem se tornando uma das espécies de cianobactérias de maior interesse de pesquisadores, em parte pelo seu potencial de produzir toxinas e formar florações, mas principalmente pelo aumento do número de relatos de sua ocorrência na última década em ecossistemas continentais de regiões tropicais, subtropicais, e mesmo temperadas (PADISÁK, 1997).

1.6 Mortalidade fitoplanctônica

Há vários estudos sobre fatores que controlam o crescimento fitoplanctônico e sua fisiologia durante o crescimento e divisão celular, porém pouco se sabe sobre fatores que afetam a mortalidade da comunidade. Reynolds (1984) refere-se à mortalidade como perdas da população e resume a taxa de dano como a soma das perdas através de *washout* hidráulico, sedimentação, herbivoria e morte celular.

O dano causado por morte celular ainda é difícil de mensurar e sua real importância nos sistemas aquáticos é desconhecida. A morte celular pode ser causada por fatores bióticos e abióticos. Os fatores bióticos estão relacionados à patógenos, infecções por bactérias e vírus (BRUSSAARD 2004, IMAI, *et al.* 1993, SUTTLE 2005). A disponibilidade de luz e nutrientes são os principais fatores abióticos que causam mortalidade (FRANKLIN, *et al.* 2006). Estudos recentes relatam uma alta morte e lise celular em populações naturais de fitoplâncton, porém a maioria destes estudos refere-se ao fitoplâncton marinho (AGUSTI, *et al.* 2006).

Os conceitos e avanços das técnicas de biologia celular vêm sendo aplicados para a quantificação de morte celular fitoplactônica (DARZYNKIEWICZ, *et al.* 1994, LEE e RHEE 1999a, LEE e RHEE 1999b). A perda da habilidade da manutenção da homeostase, resultante de alterações na integridade de membrana, é um dos indícios de morte celular (DARZYNKIEWICZ, *et al.* 1994, ELLIS, *et al.* 1991). Em vista disso, testes de permeabilidade de membrana foram desenvolvidos e vêm sendo usados para a discriminação entre células vivas e mortas (ELLIS *et al.*, 1991; DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1994). Recentemente, tais testes são usados, com sucesso, para quantificar a proporção de células vivas e mortas nas comunidades

fitoplanctônicas naturais e em experimentos em laboratório (AGUSTÍ 2004, LEE e RHEE 1997, LEE e RHEE 1999b, LLABRES e AGUSTI 2006).

O processo de morte celular em organismos fitoplanctônicos vem sendo alvo de diversos estudos. Já é conhecido que estes organismos não possuem somente morte celular através de lise ou necrose. Trabalhos recentes mostram que existem mecanismos de morte celular programada (apoptose) com a ação de importantes indicadores moleculares neste processo, como a presença de enzimas tipo caspase, enzima mediadora de processo apoptótico, inversão da proteína de membrana fosfatidilserina e fragmentação do DNA (MOHARIKAR, *et al.*, 2006, NING, *et al.*, 2002, ZUPPINI, *et al.*, 2007)

A capacidade de identificar células vivas e mortas na comunidade fitoplanctônica abre novos caminhos para o estudo da dinâmica de população em lagos que permite incluir perdas na população por meio da morte celular e discutir seu significado na evolução da estrutura da comunidade, persistência de espécies, estabilidade ou perturbação. Esses e outros aspectos foram negligenciados no passado, por falta de metodologias precisas disponíveis para a quantificação de morte celular (AGUSTI, *et al.* 2006).

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

1- Avaliar alterações ultraestruturais e morte celular em *Cylindrospermopsis raciborskii* sob efeito da radiação ultravioleta.

2- - Padronizar a preparação de citocentrifugados para estudos de cianobactérias à microscopia de fluorescência

2.2 Objetivos Específicos

1- Estudar a cinética de morte celular na cepa LETC CIRF-01 de *Cylindrospermopsis raciborskii* no período de 2, 4 e 6 horas de tratamento com a radiação ultravioleta (UVA, UVB e UV (A+B)) através da avaliação da densidade celular;

2- Avaliar a ocorrência e proporção de morte celular em *Cylindrospermopsis raciborskii* através do uso de marcador fluorescente para integridade de membrana após 6 horas de tratamento;

3- Analisar a ultraestrutura da mesma cepa de *C. raciborskii* através de microscopia eletrônica de transmissão;

4 – Avaliar a ocorrência de alterações ultraestruturais da cepa em questão, sob efeito da radiação ultravioleta (UVA, UVB e UV (A+B));

3. Materiais e Métodos

3.1 Cultura Estoque

Para os diferentes experimentos, foi utilizada a cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii*, LETC CIRF-01, gentilmente cedida pela Dra. Sandra Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A cepa CIRF- 01 caracteriza-se por produzir toxinas do tipo saxitoxinas e goniatoxinas (FERRÃO-FILHO, *et al.* 2009).

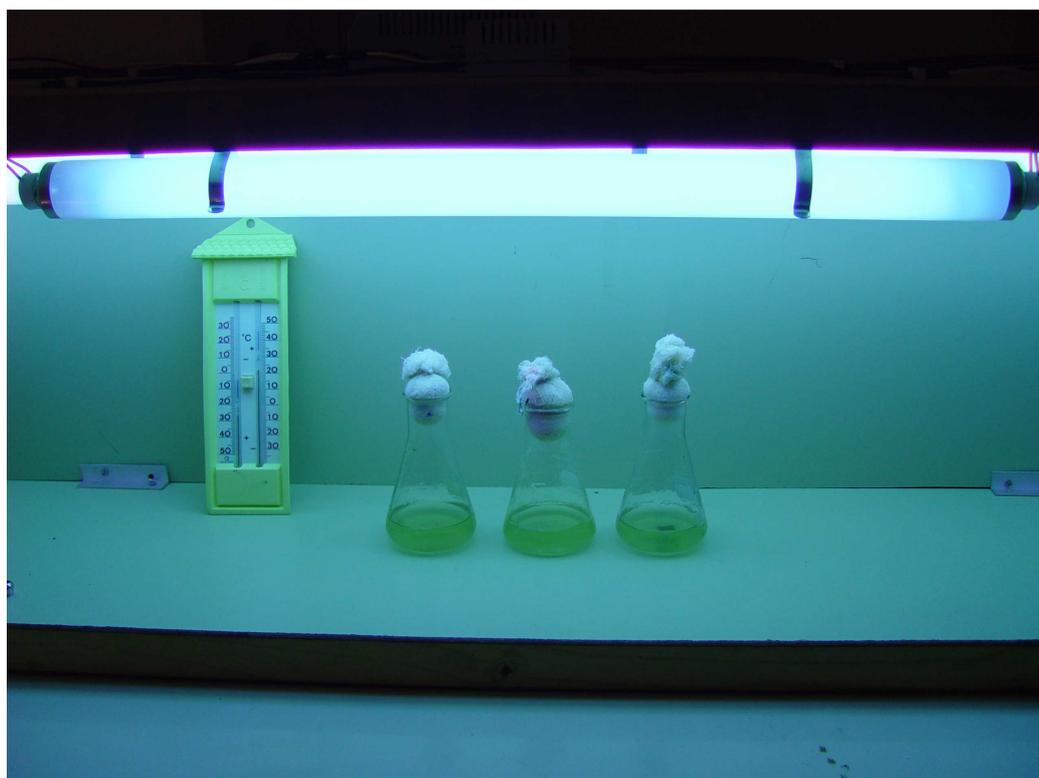
A cepa estoque foi mantida no Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora, em meio ASM-1 (GORHAM, *et al.* 1964), a 22 °C e 310 $\mu\text{mol f\acute{o}ton m}^{-2}\text{s}^{-1}$, em fotoperíodo de 12:12 horas. O cultivo foi unialgal, não axênico (com presença de bactérias), em cultura tipo “batch”, no qual os nutrientes vão diminuindo e o número de células aumenta até a capacidade suporte. Ressalta-se que neste tipo de cultivo há indivíduos em todos os estágios de crescimento e o estado fisiológico de cada indivíduo não é necessariamente igual.

3.2 Experimentos com radiação ultravioleta

3.2.1 Lâmpadas

Foram utilizadas lâmpadas artificiais com radiação ultravioleta (UV), TL 40/05 e TL 20/01 (Philips), com pico de emissão em 365 e 312 nm, representando as faixas de comprimento de onda ultravioleta A (UV-A) e ultravioleta B (UV-B),

respectivamente. Tais lâmpadas, instaladas em um compartimento de madeira com dimensões de 122 x 36 x 32 cm, foram mantidas em uma sala de temperatura controlada a 22 °C (Fotografia 1).



Fotografia 1: Foto representativa dos experimentos com radiação ultravioleta mostrando a disposição da lâmpada sobre os frascos com cultura de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Como base para a determinação das intensidades utilizadas no experimento, foi medida a radiação ultravioleta solar, no dia 14 de abril de 2009, na cidade de Juiz de Fora (MG), no período de 7:00 às 17:00. Tal dia caracterizava-se por ser um dia sem a cobertura de nuvens. O radiômetro modelo IL 1400A (International Light) foi utilizado para realização das medições a cada 1 hora. Ao final, os valores escolhidos para o experimento, baseando-se nos valores encontrados nas medições de radiação solar, foram: 11,8 W m⁻² para UV-A e 0,54 W m⁻² para UV-B.

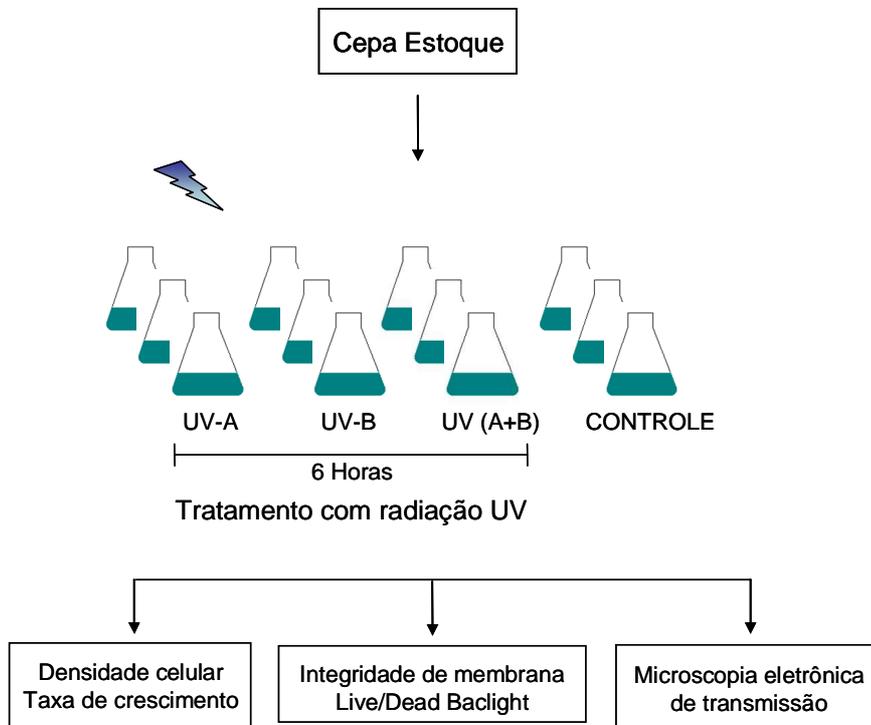
3.2.2 Desenho Experimental

A concentração utilizada a partir da diluição da cultura estoque foi de diluída a 10^6 células. ml⁻¹. Previamente ao início do experimento, tanto as réplicas do controle, quanto as dos tratamentos foram mantidas sob as mesmas condições do cultivo, em um período de, aproximadamente, 24 horas, a fim de estabilizar a cultura após a diluição da concentração inicial. Réplicas da alíquota da diluição da cultura estoque foram submetidas a tratamentos com UV (UV-A + UV-B), UV-A, UV-B e controle. No tratamento controle, as cepas foram mantidas sob as mesmas condições, sendo conservadas no próprio local do cultivo. No tratamento UV (A+B), as réplicas foram mantidas sob efeito de ambas as lâmpadas ligadas, enquanto para os tratamentos UV-A e UV-B, as lâmpadas foram mantidas ligadas tempos distintos.

Os tratamentos tiveram duração total de seis horas sob a influência de cada luz, em frascos de quartzo (tratamento UV-A) e erlenmeyer (tratamentos UV-B e UV (A+B)) com o volume de 40 ml. No caso dos tratamentos UV-B e UV (A+B) a utilização de frascos de borossilicato (erlenmeyer) deve-se à capacidade deste material de barrar radiação UV, principalmente UV-B, uma vez que a intensidade da emissão da lâmpada deste comprimento de onda foi superior à intensidade necessária para o experimento. No caso do tratamento UV-A, o uso de frascos de quartzo foi devido à alta capacidade de transmitância deste material, ou seja, a intensidade utilizada no experimento foi a correspondente a emissão total da lâmpada UV-A.

Amostras foram retiradas a cada duas horas para a análise de densidade celular. Para a análise de integridade de membrana e modificação ultraestrutural, as

amostras foram retiradas ao final do período de seis horas. Antes de cada amostragem os fracos foram devidamente homogeneizados manualmente (Desenho 2).



Desenho 2: Desenho experimental

3.3 Análise da densidade celular

A densidade de *C. raciborskii* foi analisada como descrito em SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA (2003), após preservação em lugol acético. O método consiste na contagem do número de células em câmara de Neubauer sob microscopia de luz. Foi utilizada objetiva de 40x, em microscópio da marca Olympus, modelo BX 41.

3.4 Taxa de mortalidade (γ)

A taxa de mortalidade da cultura foi verificada através da densidade celular. As taxas relativas de mortalidade (γ) foram derivadas de LEE e RHEE (1999) e calculadas como:

$$\gamma = (\ln N_2 - \ln N_1) (t_2 - t_1)^{-1},$$

sendo γ a taxa de mortalidade, N_2 o logaritmo natural da densidade de células mortas no tempo final e N_1 logaritmo natural da densidade de células mortas no tempo inicial de cada experimento. A densidade inicial de células mortas de cada tratamento foi estimada a partir dos dados gerados através da análise de integridade de membrana que será explicada detalhadamente no item 3.6.

3.5 Preparação de citocentrifugados

O uso de preparações em citocentrífuga apresenta ampla utilização para estudos de suspensões celulares de diferentes naturezas. Tal técnica é bastante usada em análises laboratoriais diversas, principalmente em citologia, hematologia e microbiologia (SCHWETZ, *et al.*, 2007, UMLAND, *et al.*, 2003). A técnica de citocentrifugação tem como fundamento a transferência de partículas que possam sedimentar de uma suspensão líquida para uma lâmina através de variações do aparelho quanto à velocidade, tempo, aceleração e quantidade de amostra depositada para centrifugação.

Amostras de *C. raciborskii* (300 μ L por amostra) com a concentração de 10^6 células. ml^{-1} foram centrifugadas em citocentrífuga (Shandon cytospin 4, Thermo Electron) a 28 x g, durante 5 minutos em aceleração média. Foram usadas lâminas

com cobertura de poli-L-lisina (Polyscience, Inc.) para facilitar a aderência dos organismos na lâmina.

Em paralelo à preparação de citocentrifugados, foi realizada a preparação de amostras em filtro de membrana de policarbonato com porosidade de 0,2 µm (Millipore) juntamente com aparato de filtração e bomba a vácuo, conforme procedimento de rotina para visualização de cianobactérias em microscopia de fluorescência (BOOTH 1993).

A distribuição da cianobactérias, em 10 campos, foi comparada nos dois métodos usados (citocentrifugados e filtros de membrana). As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência BX-60 (Olympus). Utilizou-se o filtro UWG, em que a excitação ocorre no comprimento de onda do verde e, a emissão, no do vermelho. A observação da distribuição dos organismos foi baseada na capacidade de autofluorescência da clorofila, a qual permite a identificação de cianobactérias sem o uso de marcadores específicos.

3.6 Avaliação da integridade de membrana

Para análise da integridade de membrana de *C. raciborskii* (viabilidade celular), foi utilizado o kit LIVE/DEAD *BacLight* (Molecular Probes, Inc.), seguindo o protocolo fornecido pela empresa. Este kit é constituído de dois marcadores. O marcador SYTO 9 tem a propriedade de corar as células vivas, emitindo fluorescência verde. Já o marcador iodeto de propídeo cora apenas as células que apresentam algum dano em sua membrana, emitindo fluorescência vermelha. Volumes iguais dos marcadores SYTO 9 e iodeto de propídeo são misturados e a cada 1ml de amostra adiciona-se 3 µl da mistura. Foi utilizado o volume de 300 µl de amostra, mantendo a

mesma proporção de marcador recomendada pelo protocolo. As amostras foram incubadas por 20 minutos no escuro.

Após a montagem em citocentrífuga, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência BX-60 (Olympus), com filtro U-MWB com a emissão no comprimento da luz azul, o qual possibilita a visualização simultânea dos marcadores. A contagem foi realizada através de transectos na lâmina até totalizar 30 filamentos medidos.

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

3.7.1 Preparação de amostras para MET

Para estudo em microscopia eletrônica de transmissão, amostras de células do cultivo submetidas a diferentes tratamentos foram coletadas e processadas de acordo com MELO, 2006. 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 0,2 M pH 7,4 sob centrifugação (675 x g a 15°C por 10 minutos) e ressuspendidas no mesmo tampão. As amostras foram, em seguida, incluídas em Agar 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, *et al.* 2007).

3.7.2 Processamento das amostras para MET

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 hora 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 minutos e por 5 minutos 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 horas, foram feitos cortes ultrafinos em ultramicrótomo (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 (Tecnai Spirit G12, FEI, The Netherlands) em 80 KV, no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais. Um total de 64 eletromicrografias foi obtido ao acaso em aumentos variando de 9.300 a 30,000X.

3.8 Captura e análise de imagens

As imagens de fluorescência foram obtidas usando microscópio de Olympus BX-60 e câmera digital Evolution VF (Media Cybernetics) acoplada ao microscópio juntamente com o programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics). Para as quantificações em micrografias eletrônicas, foi utilizado o programa de imagem ImageJ.

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir da avaliação da densidade celular, taxa de crescimento e morte celular foram analisados através do *software* JMP 5.0.1 utilizando ANOVA *one-way* como teste de variância e, em seguida, o teste-t de Student foi usado para verificar diferenças entre os tratamentos.

4. Resultados

4.1 Luz ambiente

Conforme mencionado no item 3.2.1, inicialmente foi realizada uma mensuração da radiação ultravioleta proveniente da luz solar com o objetivo de ser o mais fiel possível às condições naturais.

O gráfico 1 mostra a variação das intensidades das radiações UV-A e UV-B ao longo do dia. O período no qual a radiação UV-A apresentou-se mais intensa foi entre as 9 e as 14 horas, variando entre 16,9 e 25 $W m^{-2}$, com o valor máximo em 11 horas (25 $W m^{-2}$). Um padrão similar ocorreu com a radiação UV-B. Foram encontrados valores mais altos entre 10 e 14 horas, apresentando uma variação entre 0,24 e 0,47 $W m^{-2}$, sendo este encontrado às 12 horas.

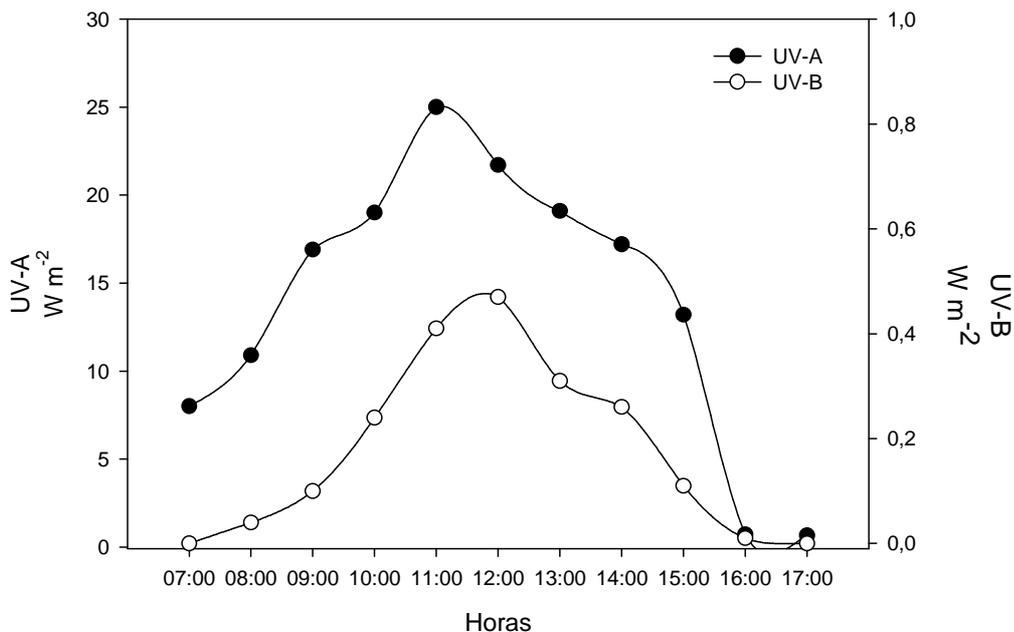


Gráfico 1: Variação das intensidades da radiação UV (UV-A e UV-B) no período entre 07 e 17 horas em um dia sem nuvens. Círculos pretos representam a radiação tipo UV-A e círculos brancos, UV-B.

4.2 Densidade e taxa de mortalidade

Os tratamentos UV-A e UV (A+B) apresentaram um maior efeito sobre a densidade celular de *C. raciborskii* comparado ao tratamento UV-B (Gráfico 2). No tratamento UV-A a densidade variou entre $1,3 \times 10^6 (\pm 0,1 \times 10^6)$ céls. ml⁻¹, no tempo inicial e $5,8 \times 10^5 (\pm 0,2 \times 10^5)$ no tempo final, notando-se uma diferença do tempo inicial apenas depois de quatro horas de experimento. Um mesmo padrão ocorreu no tratamento UV, onde a densidade inicial e a final variaram entre $9,5 \times 10^5 (\pm 0,2 \times 10^6)$ e $3,7 \times 10^5 (\pm 0,6 \times 10^5)$ céls. ml⁻¹, respectivamente, porém foi notado diminuição da densidades nas primeiras duas horas do experimento. A análise *one-way* ANOVA indicou uma diferença significativa entre os tempos iniciais e finais nos tratamentos UV-A ($F = 9,58$; $p = 0,0001$) e UV (A+B) ($F = 8,92$; $p = 0,0002$), enquanto que o tratamento UV-B indicou igualdade entre os tempos ($F = 0,9625$; $p = 0,4894$).

Em relação às taxas de mortalidade (γ) (Gráfico 3), o tratamento UV-A apresentou maior valor ($2,29 \text{ h}^{-1}$), enquanto que nos tratamentos UV-B e UV (A+B) foram encontrados menores valores ($0,42$ e $0,33 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). A análise de variância indicou diferença significativa entre os tratamentos UV-A, UV (A+B) e UV-B e o tratamento controle ($F = 136$; $p = 0,0001$) e o teste t de *Student* indicou uma igualdade entre os grupos UV-B e UV (A+B).

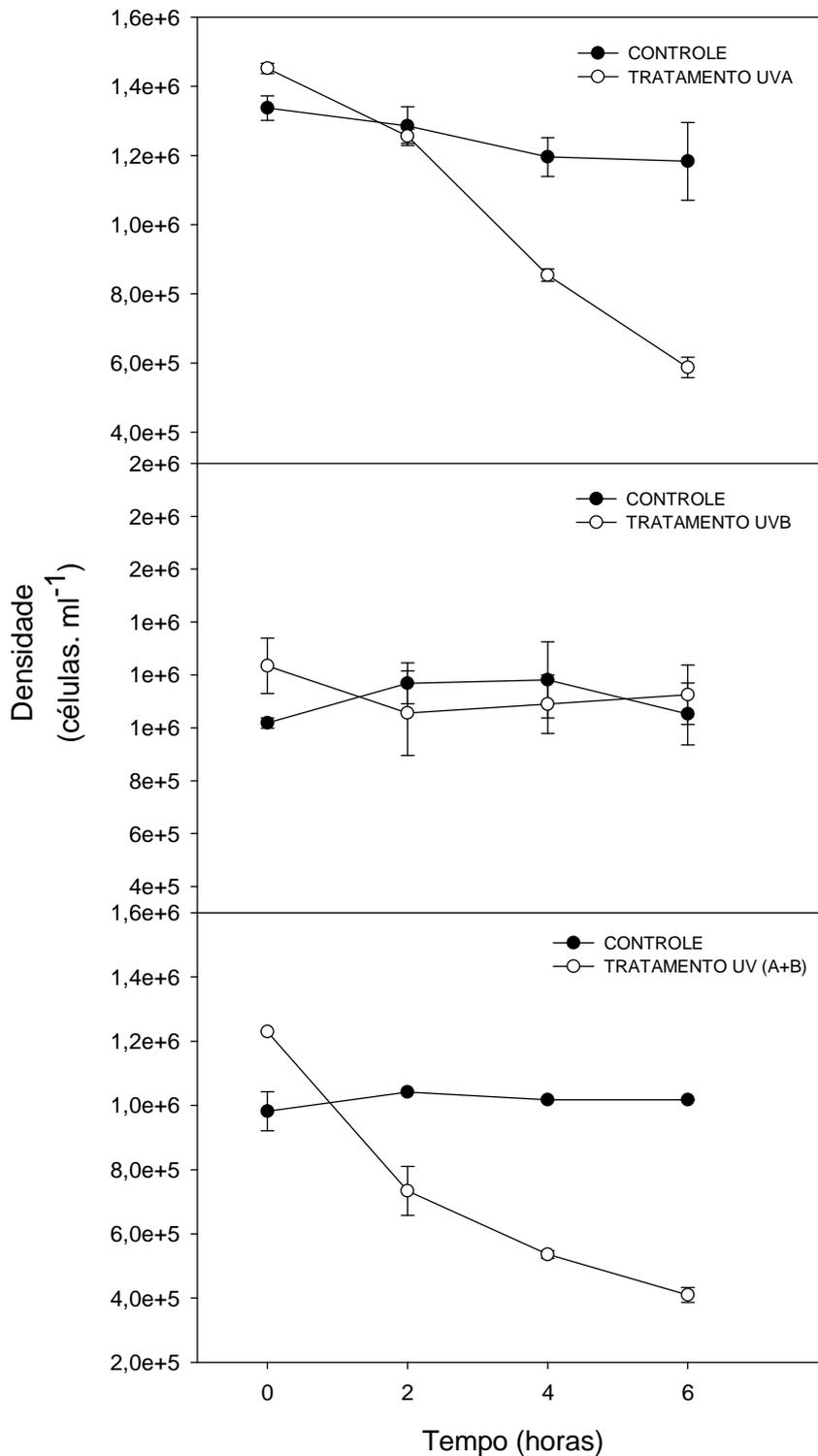


Gráfico 2: Densidade celular (células. ml⁻¹) ao longo do tempo nos tratamentos (UV-A, UV-B e UV (A+B))

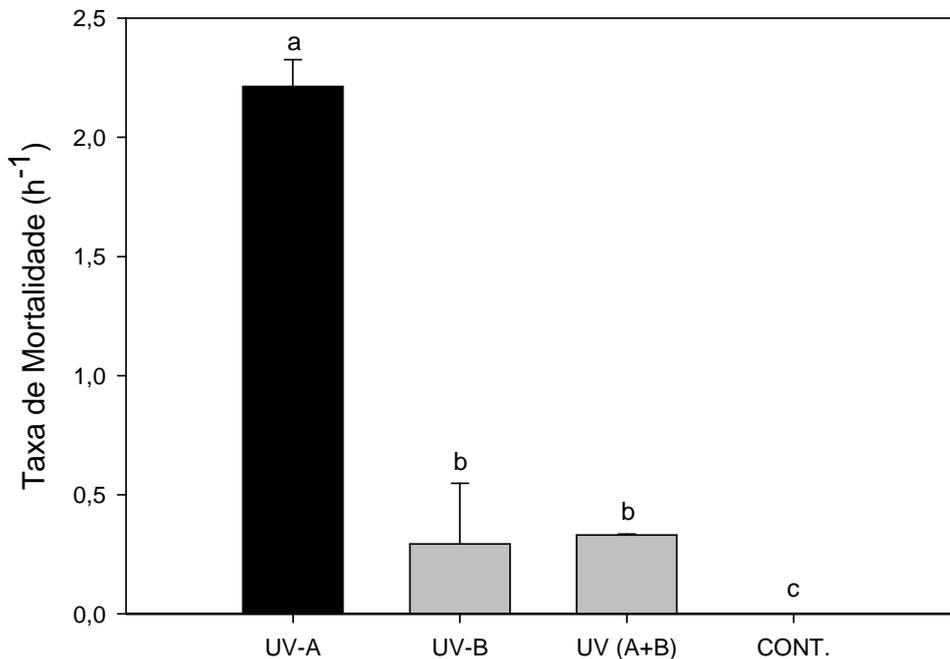
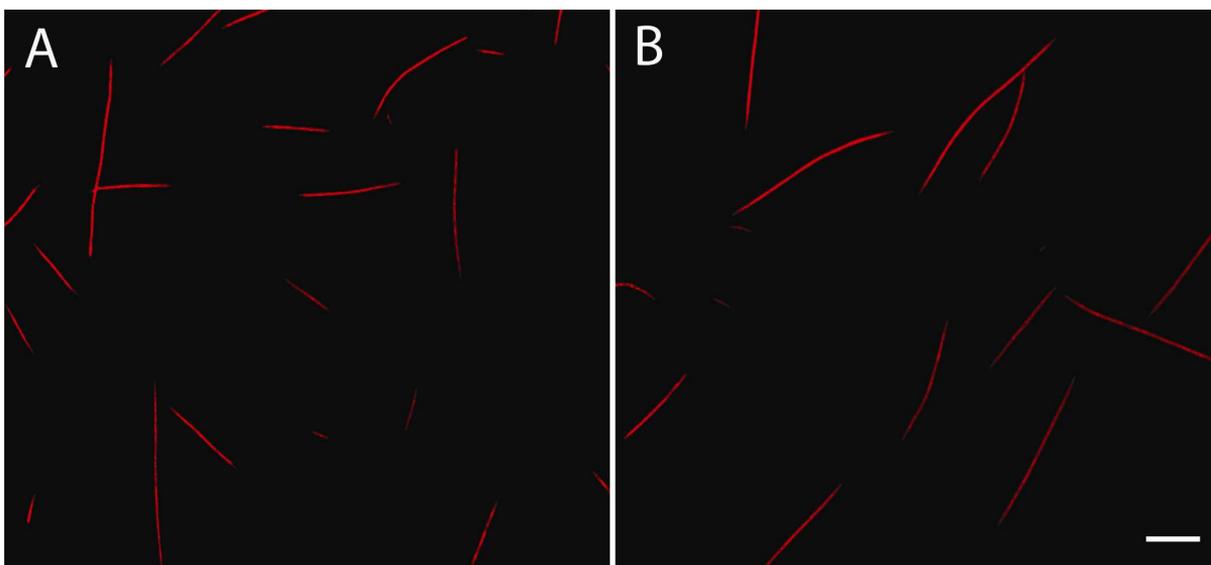


Gráfico 3: Taxas de mortalidade de *Cylindrospermopsis raciborskii* baseadas na densidade em três tratamentos com radiação ultravioleta (UV-A, UV-B, UV (A+B)) e controle. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variâncias.

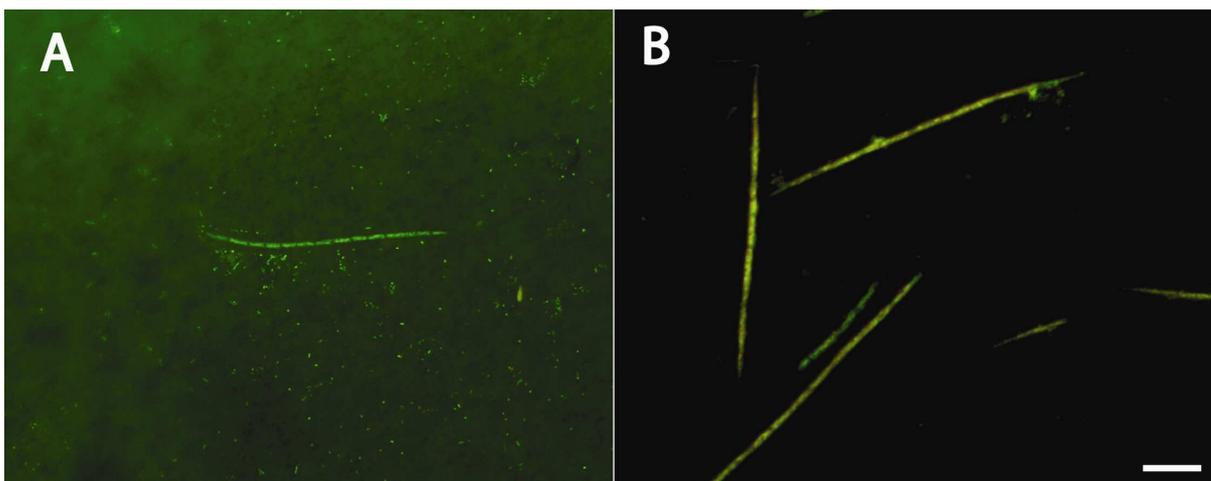
4.3 Comparação da distribuição de cianobactérias utilizando-se citocentrifugação e filtração por filtro de membrana

Para facilitar os estudos de cianobactérias com marcadores fluorescentes, foi inicialmente realizada uma comparação de dois métodos de preparação de amostras: filtração em filtros de polycarbonato e citocentrifugação. A micrografia 2 ilustra a distribuição dos filamentos autofluorescentes de *C. raciborskii* em um campo aleatório observado com o método de filtração (A) e citocentrifugação (B). Não foi observada diferença aparente quanto à distribuição dos organismos na lâmina, quando os dois métodos foram comparados sem o uso de marcador. No entanto, quando foi usado marcador fluorescente para células viáveis (SYTO 9), uma melhor visualização dos filamentos, foi documentada nas preparações por citocentrífuga

(Micrografia 3B) quando comparadas com as preparações obtidas por filtração (Micrografia 3A). As preparações usando-se filtro de membrana mostram “background” acentuado uma vez que a coloração é realizada sobre o filtro e não diretamente sobre a lâmina como é o caso do citocentrifugado.



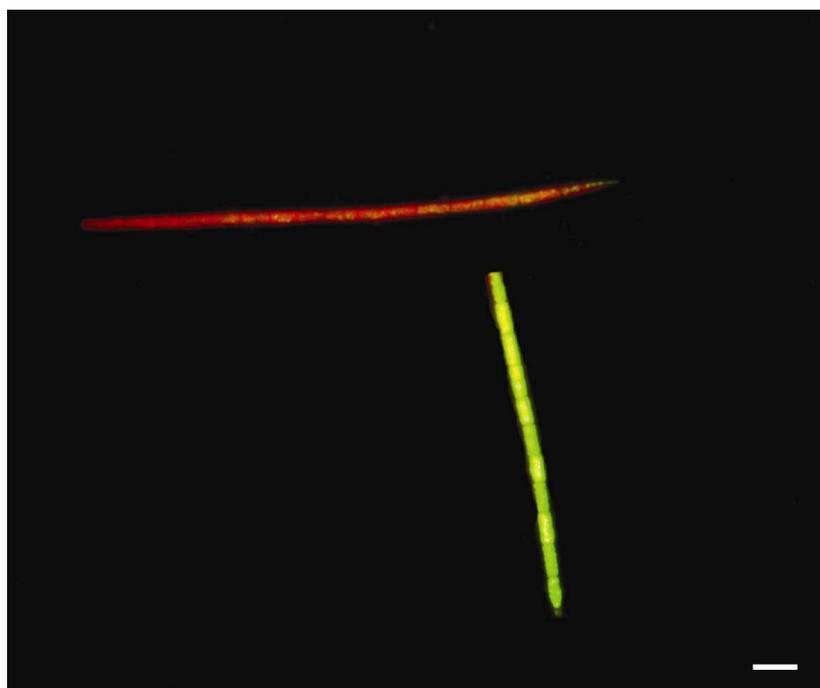
Micrografia 2: Comparação dos dois métodos de preparação de lâminas para visualização de *Cylindrospermopsis raciborskii* sem uso de marcador fluorescente. Em (A), com o uso de citocentrífuga e, em (B), com filtro de polycarbonato e bomba a vácuo. A fluorescência em vermelho corresponde a autofluorescência da clorofila presente nas células. Barra = 25 µm



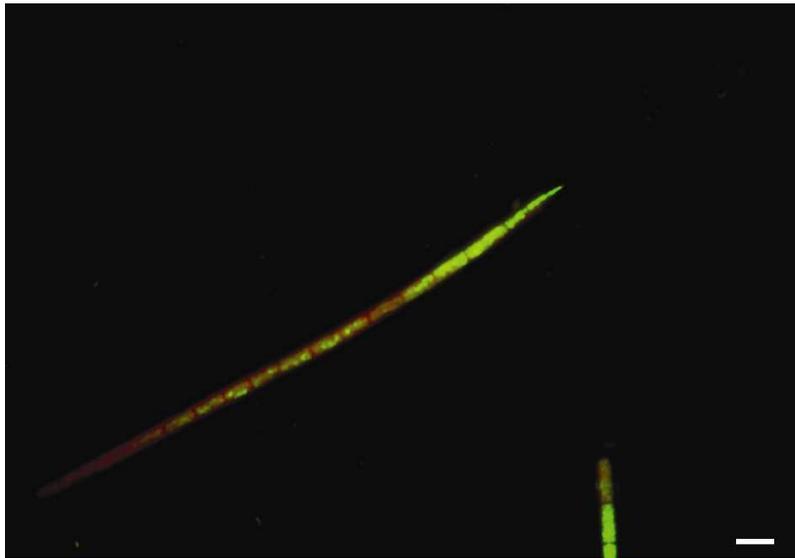
Micrografia 3: Micrografias comparativas dos métodos de preparação de lâminas para visualização de *Cylindrospermopsis raciborskii* com o uso de marcador fluorescente. (A) Uso de filtro de membrana e (B) uso de citocentrifugação. As duas lâminas foram coradas com marcador SYTO 9 para viabilidade celular. Barra = 10 µm.

4.4 Integridade de membrana

A avaliação da integridade de membrana é usada como indicativo da viabilidade celular. Células com membranas alteradas, quando coradas pelo marcador *BacLight*, emitem fluorescência em cor vermelha, enquanto células intactas (vivas) coram-se em verde (Micrografia 4). Em um mesmo filamento foi encontrada dupla coloração, ou seja, a presença de células vivas e mortas no filamento (Micrografia 5).



Micrografia 4: Micrografia representativa da dupla marcação usando-se o kit LIVE/DEAD *BacLight*. O filamento marcado em fluorescência vermelha indica células não viáveis enquanto o corado em verde mostra células viáveis. Barra = 10 μm



Micrografia 5: Micrografia de *Cylindrospermopsis raciborskii* mostrando células coradas com diferentes marcadores em um mesmo filamento. Células viáveis estão coradas em verde enquanto células não-viáveis, em vermelho. Barra = 10 μm .

Em relação aos dados do marcador de integridade de membrana, os três tratamentos apresentaram diminuição significativa em relação à porcentagem de células vivas entre o tempo inicial e final do experimento (UV-A $F = 18878$, $p < 0,0001$; UV-B $F = 402,51$, $p = 0,0002$; UV (A+B) $F = 84,31$, $p = 0,0023$). Os tratamentos UV-A e UV (A+B) apresentaram porcentagem final de células vivas de 0,7 e 5%, respectivamente, enquanto que o tratamento UV-B apresentou 43% na mesma análise. Deste modo, os resultados de UV-A e UV (A+B) foram agrupados como similares, diferente do tratamento UV-B (Gráficos 4 e 5).

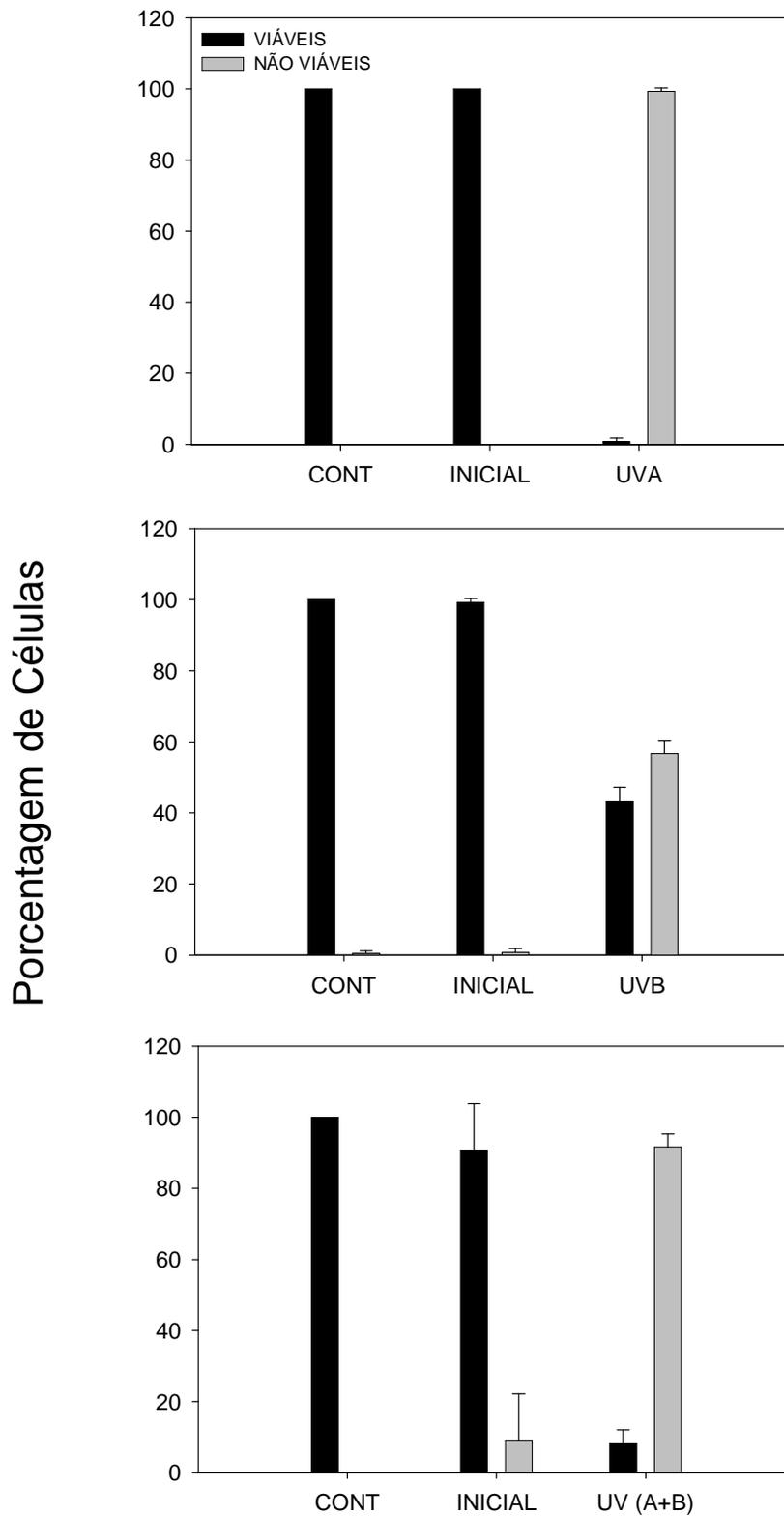


Gráfico 4: Porcentagem de células com membrana intacta (viáveis) e membrana injuriada (não viáveis) nos tratamentos UV-A, UV-B e UV (A+B). CONT – tratamento controle.

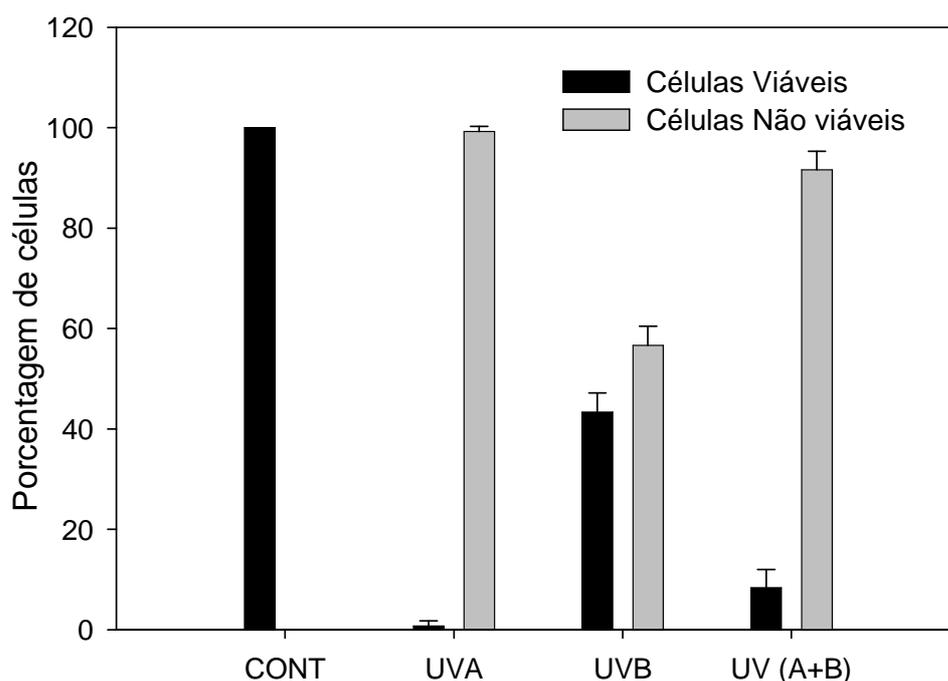


Gráfico 5 Porcentagem de células viáveis no final dos tratamentos UV-A, UV-B e UV (A+B). CONT – tratamento controle.

4.4 Ultraestrutura

4.4.1 Controle

Cianobactérias da espécie *C. raciborskii* apresentaram-se como células alongadas em cortes transversais, com diâmetro de aproximadamente 4 μm no eixo maior da célula (Eletromicrografia 1A). A análise ultraestrutural mostrou a presença de um envoltório constituído por três camadas: uma membrana mais interna (membrana plasmática), uma intermediária (parede celular) e uma membrana externa (Eletromicrografia 1B e C). A membrana interna e externa mostrou estrutura trilaminar típica, enquanto a parede celular mostrou-se constituída por material elétron-denso. Entre a parede celular e as duas membranas observou-se o espaço periplasmático. Essa organização externa é típica de cianobactérias e bactérias

gram-negativas (JENSEN 1993). Na superfície extracelular, aderida à membrana externa, foi verificada a presença de uma bainha mucilaginosa, que é composta principalmente de polissacarídeos e típica de alguns grupos de cianobactérias formadoras de colônias (JENSEN 1993).

O citoplasma desta cepa foi caracterizado por número acentuado de tilacóides (Eletromicrografia 1). Associados à parede dos tilacóides, observaram-se estruturas elétron densas com o diâmetro médio de 25 nm (Eletromicrografia 3). Estas estruturas são denominadas ficobilissomos e podem conter dois pigmentos acessórios da fotossíntese: ficocianina e/ou ficoeritrina.

Outras estruturas foram identificadas com frequência no citoplasma: inclusões lipídicas, corpos poliédricos (carboxissomos), grânulos de polifosfato e vesículas de gás (Eletromicrografia 2). Os corpos poliédricos, estruturas ligadas ao processo de fixação do carbono durante a fotossíntese, foram observados isolados ou em grupos e em associação com os tilacóides (Eletromicrografia 4). Cada corpo apresentava uma área variando de 42 a 90 nm², tendo sido encontrados de 2-5 corpos por secção celular.

Inclusões lipídicas foram observadas em todas as células estudadas (Eletromicrografia 2Bi). São esféricos, elétron densos, com aproximadamente 15 inclusões por célula, variando entre 50 a 90 nm de diâmetro. Estas inclusões foram observadas distribuídas em todo o citoplasma, principalmente na região periférica da célula.

Foram observados grânulos de polifosfato os quais são caracterizados por agregados elétron-densos de fosfatos de forma grosseiramente arredondada, com superfície irregular e diâmetro de cerca de 0,3 µm (Eletromicrografia 2C). Estes

grânulos têm a função de reserva de fosfato para síntese de ácidos nucléicos e fosfolípídios ou servem como fonte de energia para a síntese de ATP (ALLEN 1984).

Vesículas de gás, as quais estão envolvidas com a flutuação do organismo, foram claramente observadas e se apresentaram como vacúolos de diferentes tamanhos e formas, com conteúdo elétron-lúcido e limitados por uma camada osmiofílica (Eletromicrografia 2Bi).

A análise das eletromicrografias revelou áreas de septo (divisão) entre células vizinhas, caracterizadas pela presença de uma parede celular comum entre as duas membranas plasmáticas (Eletromicrografia 3). As células unidas pelo septo apresentavam membrana externa e espaço periplasmático contínuos (Eletromicrografia 3A).

4.4.2 Tratamentos

A ultraestrutura de *C. raciborskii* foi avaliada após tratamento com as radiações UV-A, UV-B e UV(A+B) três tratamentos induziram nítida rarefação da proporção de tilacóides (Eletromicrografia 5). Análises quantitativas das eletromicrografias, usando o software *ImageJ*, revelaram uma diminuição da área ocupada por tilacóides em todos os tratamentos em relação ao grupo controle. O tratamento UV-A apresentou uma redução de 94% área ocupada por tilacóides comparando a área encontrada no tratamento controle, enquanto os tratamentos UV-B e UV (A+B) apresentaram uma redução de 77 e 81% da área celular, respectivamente.

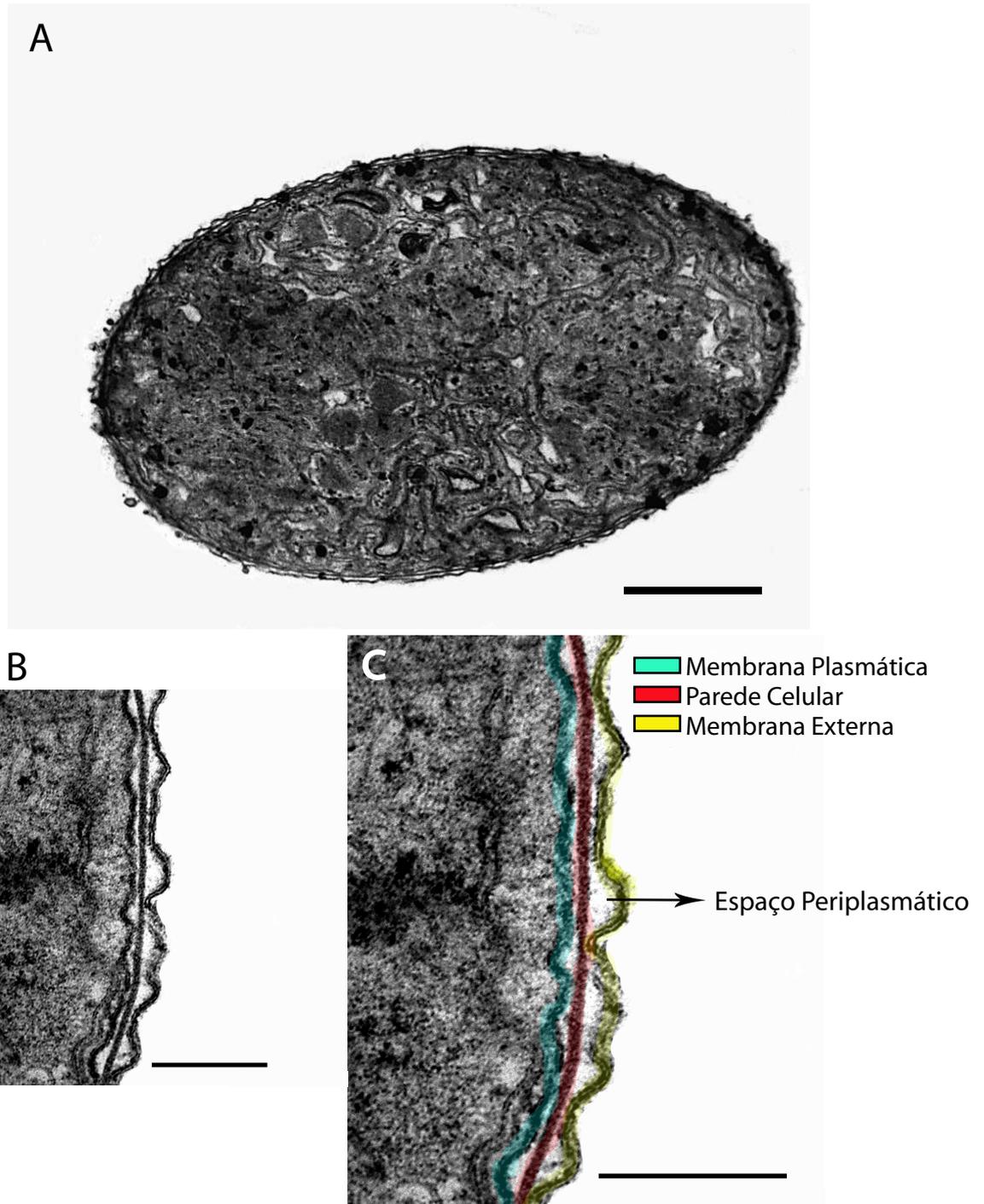
Os ficobilissomos, estruturas associadas aos tilacóides, mostraram-se em processo de aparente dissolução e dispersos no citoplasma em áreas com matriz

citoplasmática nitidamente mais elétron-densa (Eletromicrografia 5B). Essa alteração foi observada principalmente no tratamento UV-A.

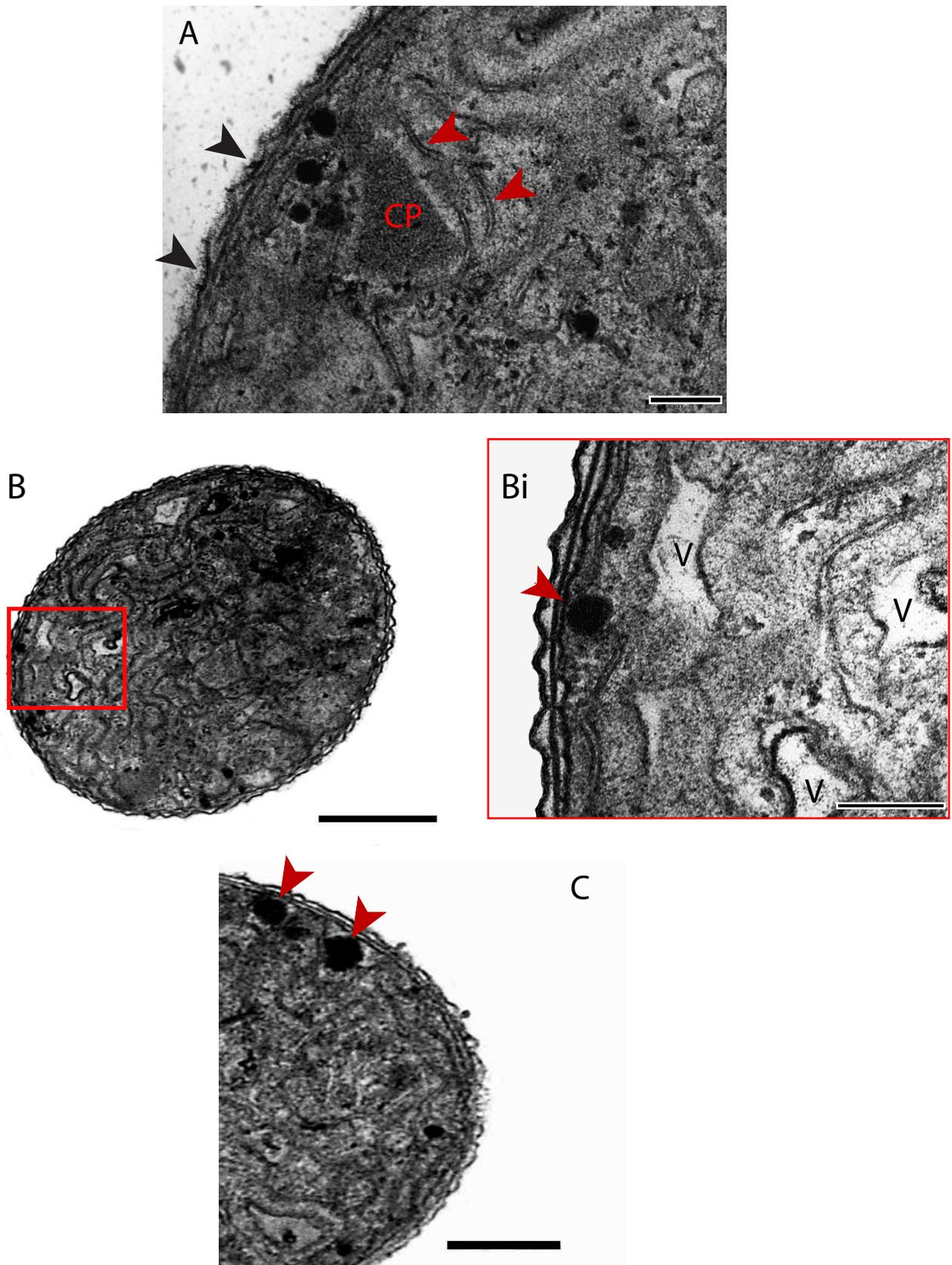
Os tratamentos UV-A e UV-B induziram diminuição significativa do número de inclusões lipídicas ($p < 0,0001$). Células tratadas com UV-A ou UV-B apresentaram 4 e inclusões lipídicas por secção celular, respectivamente, representando uma redução de 74%-76% no número dessas estruturas.

Outra alteração ultraestrutural observada foi a perda da integridade das três camadas limitantes da célula (membrana interna, parede e membrana externa), com áreas apresentando ausência de distinção entre três camadas (Eletromicrografia 6).

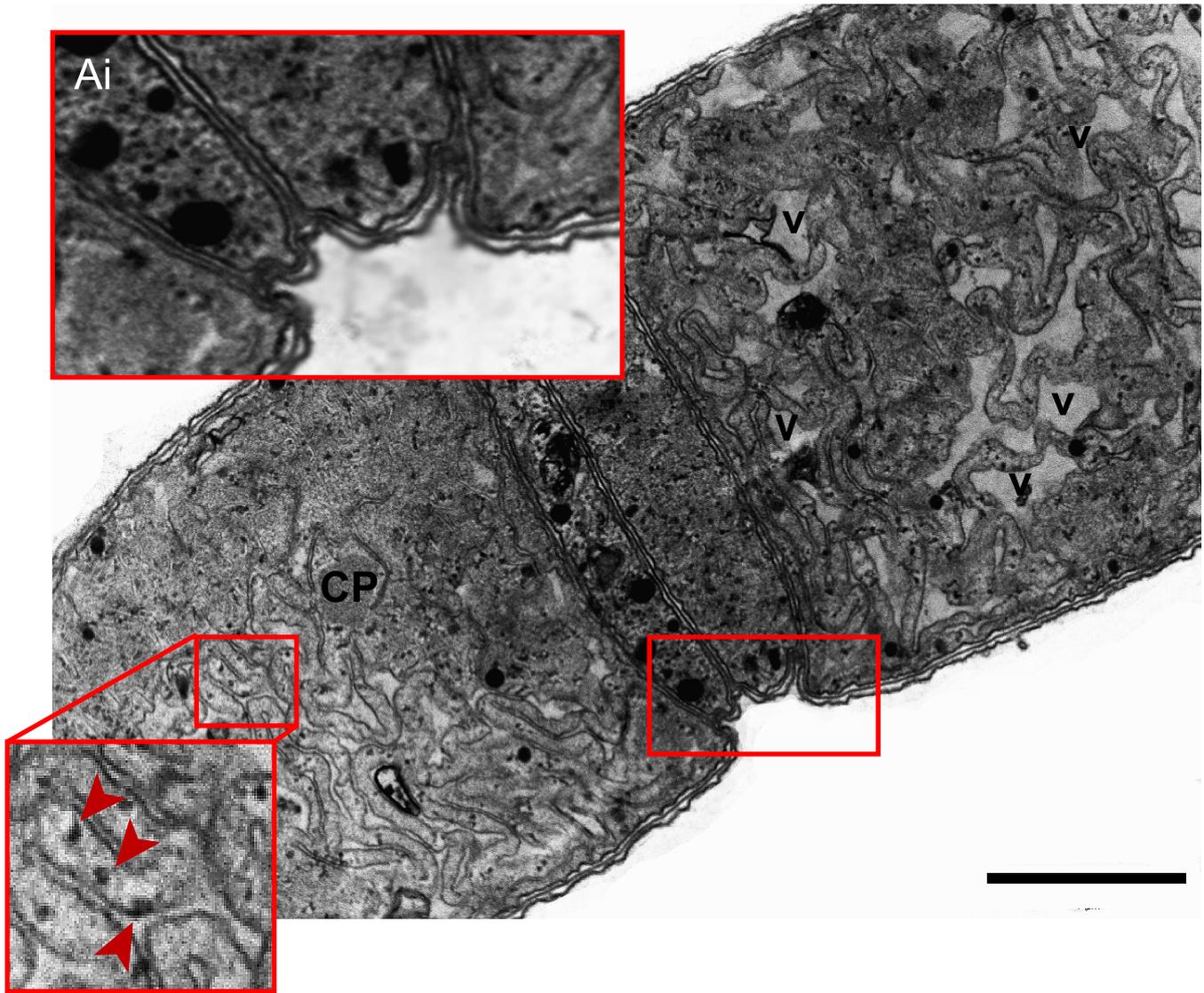
Os corpos poliédricos não mostraram alterações estruturais e em número em nenhum dos grupos tratados. No entanto, os grânulos de polifosfato apresentaram-se nitidamente desestruturados em comparação com os controles (Eletromicrografia 7). Essa alteração foi observada principalmente após tratamento com UV-B.



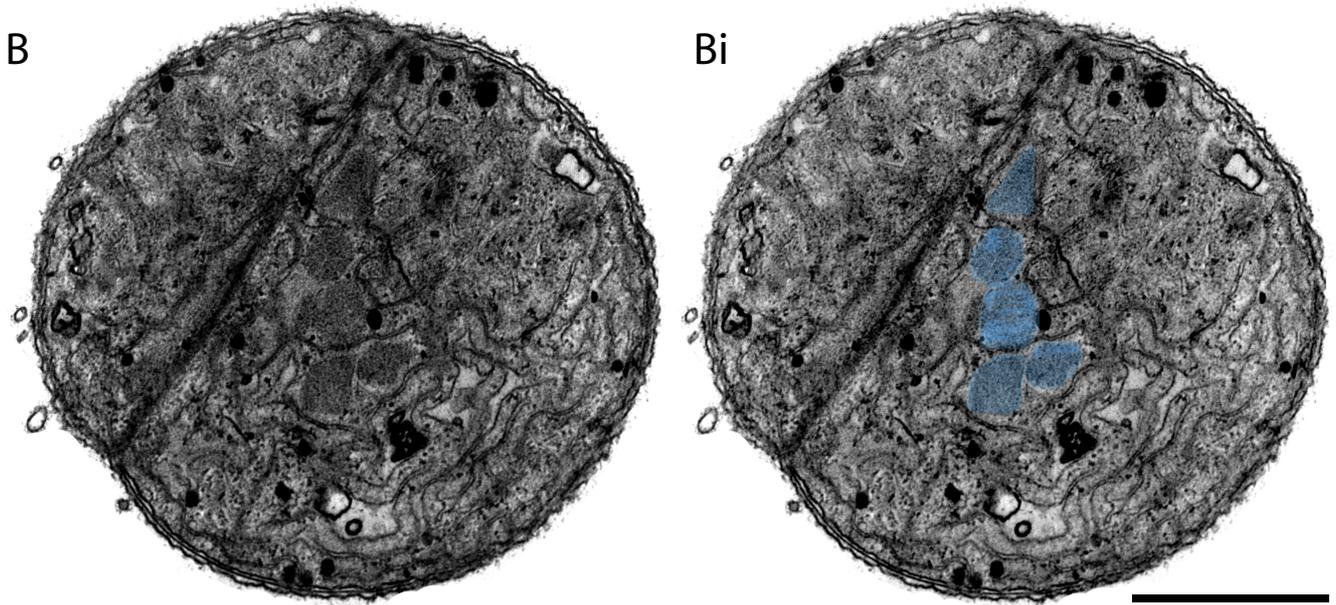
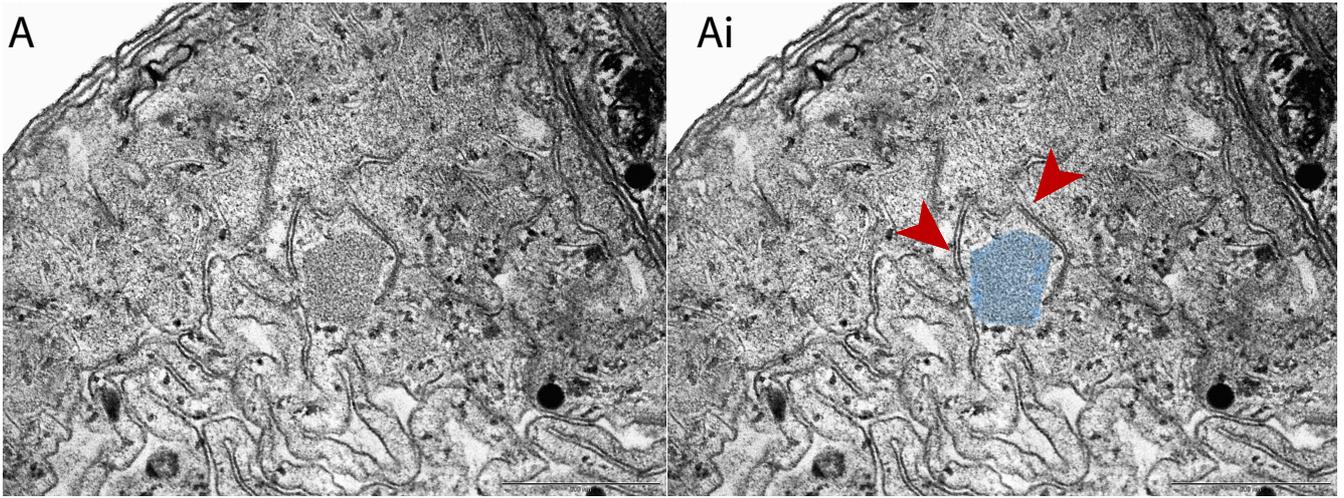
Eletromicrografia 1: Eletromicrografia da célula de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Em (A), corte transversal da célula. Em (B e C), detalhe em alta magnitude das três camadas do envoltório celular: membrana plasmática, parede celular e membrana externa. Barras: (A) = 1 μm e (B e C) = 200nm.



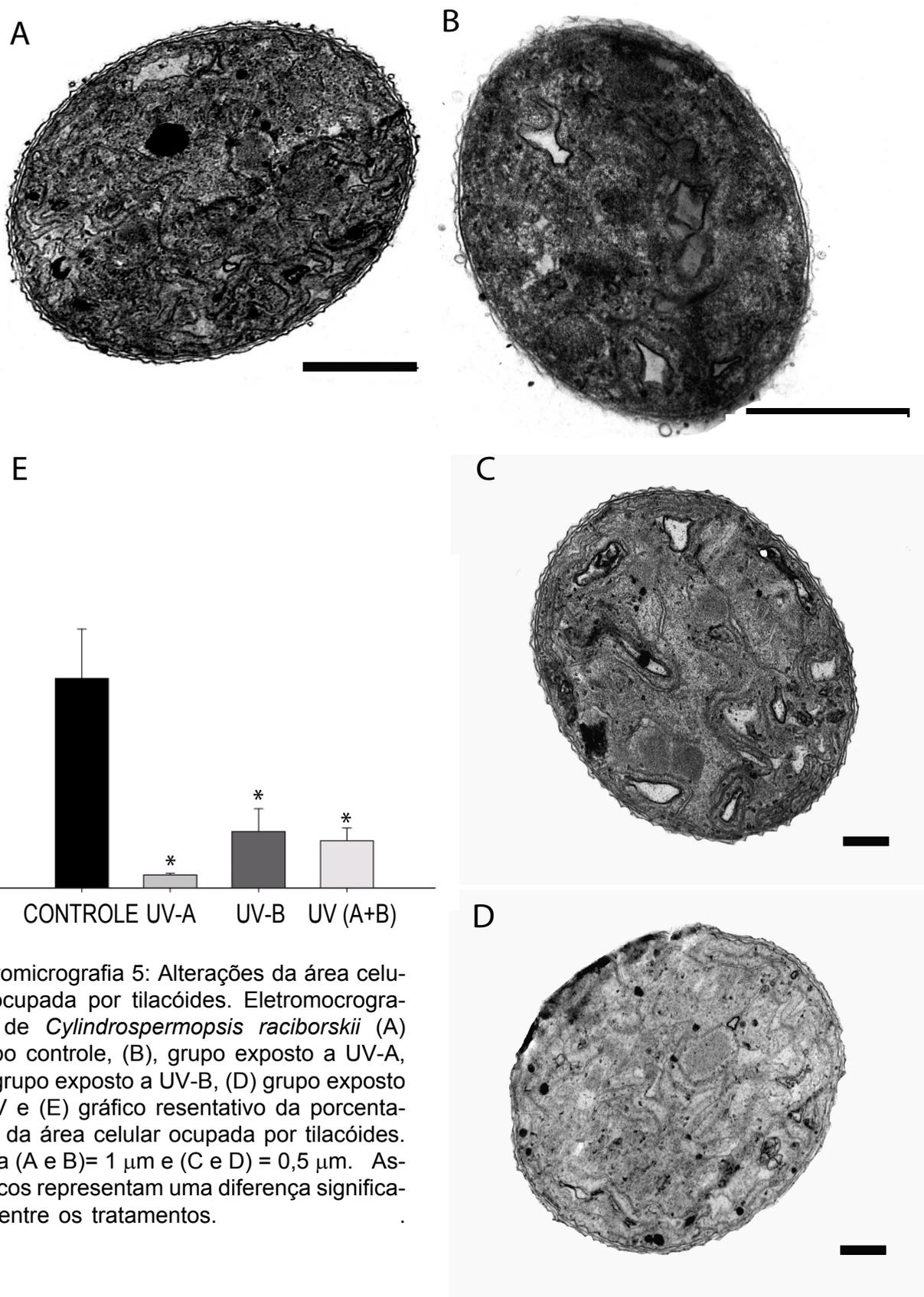
Eletromicrografia 2: Eletromicrografias de cortes transversais de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Em (A) as setas pretas indicam a camada de mucilagem externa à célula, as setas vermelhas apontam os tilacóides e CP indica um corpo poliédrico. Em (B e Bi) nota-se a presença de vesículas de gases (V) e as setas vermelhas mostram inclusão lipídica. Em (C), as setas vermelhas apontam os grânulos de polifosfato. Barra em (A e Bi) = 200 nm; (B) = 1 μm e (C) = 2 μm .



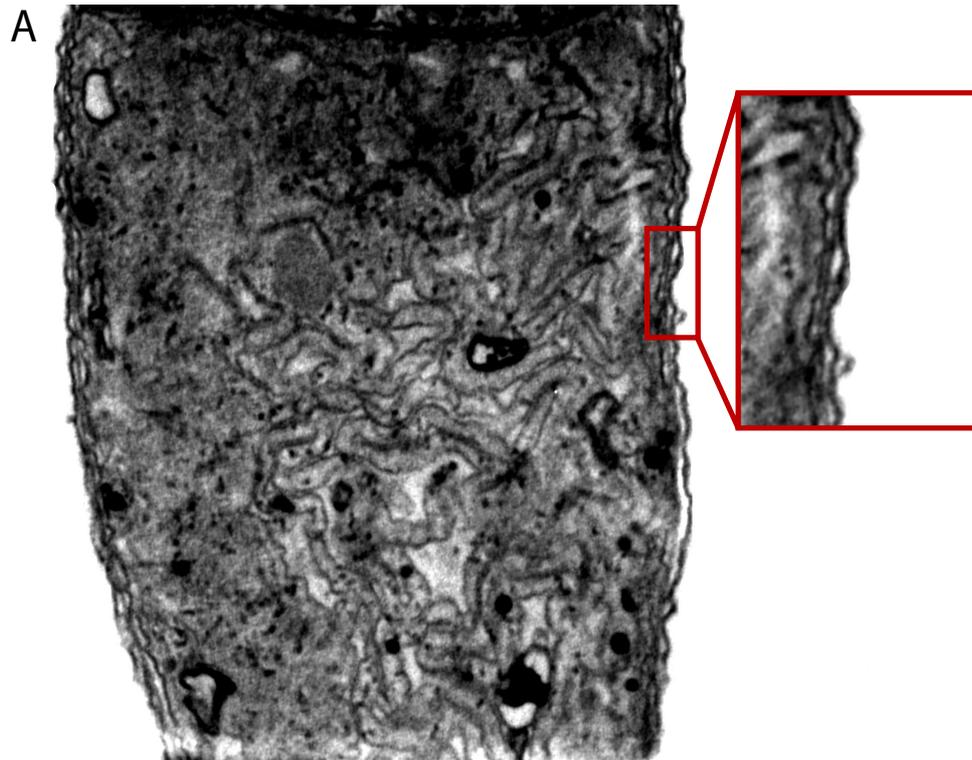
Electromicrografia 3: Corte longitudinal de um filamento contendo quatro células. Nota-se a presença de vesículas de gás (V), e corpo poliédrico (CP). A seta vermelha indica ficobilisomo. O retângulo vermelho evidencia os septos entre as células e, em (Ai) mostra, em detalhe, a característica de três camadas do envelope celular. Nota-se que a membrana externa e o periplama são contínuos ao longo das células vizinhas. Barra = 1 μm .



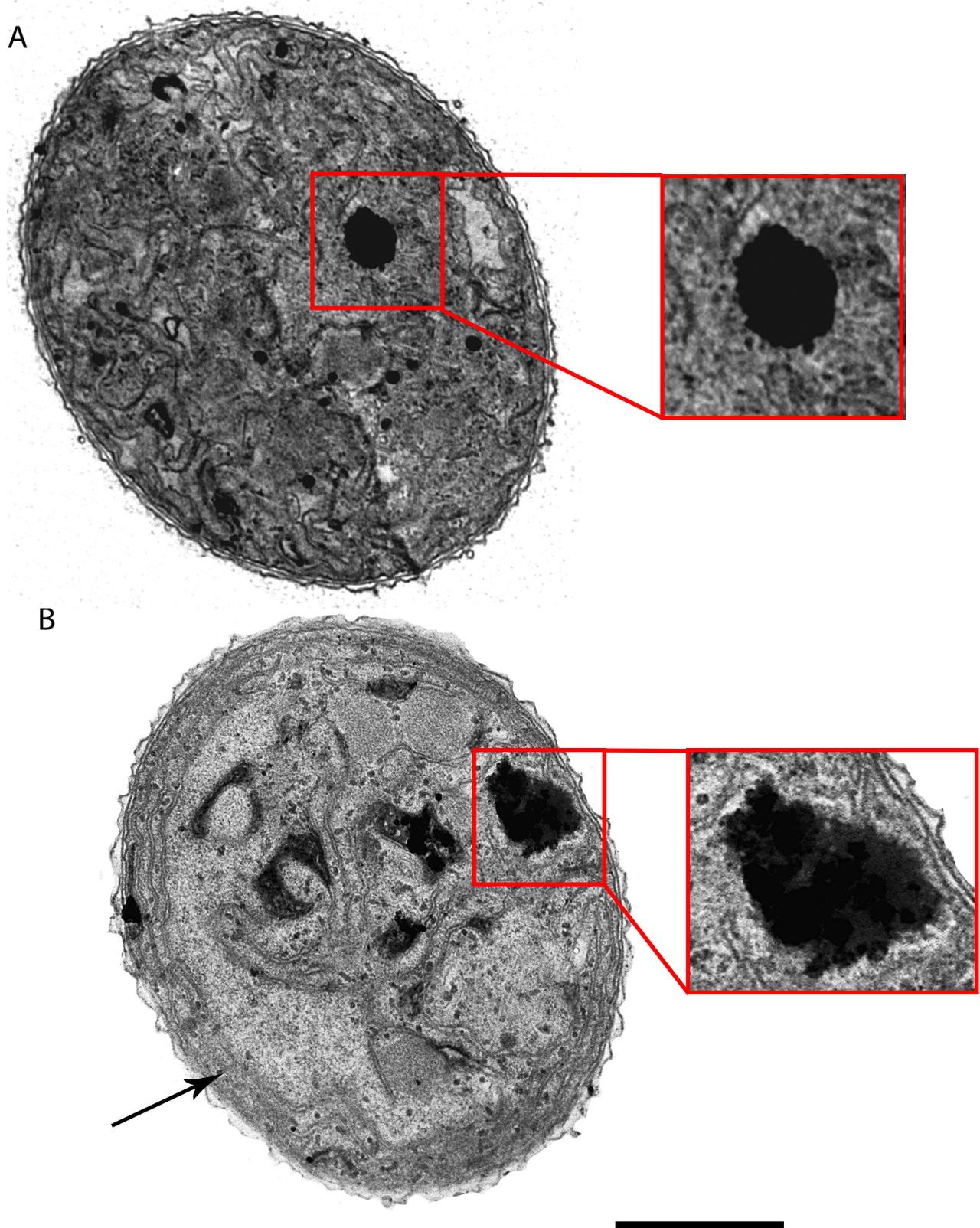
Eletromicrografia 4: Eletromicrografia de corte transversal evidenciando a disposição de corpos poliédricos nas células. Em (A), mostra um estrutura isolada e, em (B), um agrupamento. Barra em (A) = 500 nm e (B) = 1 μ m.



Eletromicrografia 5: Alterações da área celular ocupada por tilacóides. Eletromicrografias de *Cylindrospermopsis raciborskii* (A) Grupo controle, (B), grupo exposto a UV-A, (C) grupo exposto a UV-B, (D) grupo exposto a UV e (E) gráfico representativo da porcentagem da área celular ocupada por tilacóides. Barra (A e B)= 1 μm e (C e D) = 0,5 μm . Asteriscos representam uma diferença significativa entre os tratamentos.



Eletromicrografia 6: Eletromicrografia de cortes longitudinais evidenciando a perda da integridade da membrana e redução dos tilacóides. Em (A) grupo controle e (B) tratamento UV-A. Barra em (A e B) = 1 μm



Eletromicrografia 7: Eletromicrografia de cortes transversais indicando desestruturação de grânulo de fosfato. Observa-se, também, a redução da área celular ocupada por tilacóides. Em (A), grupo controle e (B), tratamento UV-B. Barra (A e B)= 1 μ m.

5. Discussão

Mesmo sendo uma pequena parte da radiação solar incidente, a radiação ultravioleta afeta vários processos fisiológicos nos organismos planctônicos, tais como crescimento e sobrevivência (SINHA, *et al.* 1995). Desta forma, pode-se considerar a avaliação da densidade celular um importante parâmetro para entendimento da dinâmica de populações em diferentes ecossistemas.

Os resultados da avaliação da densidade de *Cylindrospermopsis raciborskii* sob diferentes tratamentos mostraram diminuição significativa da densidade celular e da taxa de mortalidade para os tratamentos UV-A e UV (A+B). No grupo UV (A+B), houve redução significativa do número de células nas primeiras duas horas de tratamento, enquanto que em UV-A, a redução da densidade foi observada após quatro horas. O tratamento UV-B, entretanto, não apresentou diminuição significativa da densidade, porém apresentou uma diferença significativa da taxa de mortalidade se comparado ao tratamento controle.

As intensidades da radiação ultravioleta utilizadas nos experimentos, $11,8 \text{ W m}^{-2}$ (UV-A) e $0,54 \text{ W m}^{-2}$ (UV-B), são consideradas moderadas comparando-se a valores encontrados em regiões de altas e médias latitudes, os quais variam entre $7-8 \text{ W m}^{-2}$ (UV-B) e $45-50 \text{ W m}^{-2}$ (UV-A) (CASTENHOLZ e GARCIA-PICHEL 2000). SINHA (1996) testou os efeitos de UV (A+B) em cinco espécies de cianobactérias, e observou morte de 100% das células após 30 minutos de experimento, com intensidade de 10 W m^{-2} . Porém, estudos com cepas da cianobactéria *Synechococcus sp* não encontraram variação da densidade sob efeito de tratamento com UV (A+B) em baixas intensidades, em período de cinco horas (SIX, *et al.* 2007). Resultados com diminuição da densidade óptica em cepa de *Microcystis aeruginosa*

foram observados após 12 horas de tratamento com radiação UV-B, entretanto foi utilizado intensidade de 5 W m^{-2} (FIJAŁKOWSKA e SUROSZ 2005), uma ordem de grandeza maior do que da utilizada no presente trabalho.

Para obter maior compreensão dos processos envolvidos na redução da densidade celular foi realizada, em paralelo, a avaliação da viabilidade celular nos mesmos grupos experimentais. Esta avaliação é amplamente usada em diferentes estudos de biologia celular e microbiologia para observação à microscopia de luz de células funcionalmente alteradas e em processo de morte (ABREU, *et al.* 2006, BERNEY 2007, D'AVILA, *et al.* 2006, RYLANDER, *et al.* 2005, STRUBINSKA 2005). Em ecologia, o termo “viabilidade celular” define a capacidade da célula em se reproduzir e aumentar sua biomassa (JOUX 1997).

Existem vários indicadores de viabilidade celular, como por exemplo, o teste de exclusão do tripan blue (TRIPATHI, *et al.* 2005) e o uso de incorporação de brometo de etídeo (MELO, *et al.* 2005). O uso do kit LIVE/DEAD *BacLight* é particularmente indicado para avaliação da viabilidade celular em microorganismos e tornou-se muito usual nos últimos anos devido ao seu procedimento prático e rápida distinção entre células viáveis e não viáveis (BOULOS, *et al.* 1999). Recentemente, o kit vem sendo empregado em estudos de microorganismos aquáticos (AGUSTI, *et al.*, 2006, FREESE, *et al.*, 2006, LEE e RHEE, 1999).

Os resultados da viabilidade celular mostraram diminuição significativa da porcentagem de células viáveis ao final dos tratamentos com as radiações UV-A e UV (A+B) (0,7% e 5% em UV-A e UV (A+B), respectivamente). O mesmo ocorreu em UV-B, no qual a porcentagem de células viáveis ao final do experimento apresentou diferença significativa em relação ao tempo inicial, embora menor quando comparada aos demais tratamentos (57% de células viáveis).

Os dados de viabilidade celular corroboraram as análises de densidade celular para os tratamentos UV-A e UV (A+B), os quais induziram expressiva redução tanto do número total de células como do número de células com alteração da permeabilidade de membrana. Embora a radiação UV-B não tenha induzido diminuição significativa da densidade celular, foi detectada alteração significativa do número de células viáveis em resposta a este tratamento. Estes resultados indicam que as células de *C. raciborskii* sob tratamento com UV-A e UV (A+B) sofreram lise celular, enquanto que, o tratamento com UV-B, na intensidade usada, induziu alteração celular sem que houvesse, necessariamente, o processo de ruptura da célula. Desta forma, demonstra-se que os três tipos de radiação são capazes de induzir alterações em *C. raciborskii*, sendo o efeito da radiação UV-B menos letal, na intensidade usada, em comparação com UV-A e UV (A+B).

Os dados de viabilidade celular são importantes porque permitem a detecção de alterações celulares que podem ocorrer previamente à lise celular. Além disso, o uso de marcadores para viabilidade celular permitiu a observação de células viáveis e não viáveis em um mesmo filamento (Micrografia 5). Esses dados demonstram a presença de células com diferentes condições fisiológicas no filamento em resposta à radiação. Tal fenômeno não foi observado em populações naturais de cianobactérias filamentosas analisadas quanto à viabilidade celular (AGUSTI, *et al.* 2006, PEARL 2000). Estes autores sugerem que as células de um mesmo filamento atuem funcionalmente em conjunto e que as alterações celulares afetem todo o grupo de células (PEARL,2000, AGUSTÍ *et al*, 2006). Com base nos resultados do presente trabalho, especula-se que, embora as células de um mesmo filamento possam interagir funcionalmente, as mesmas respondem de forma ou em tempos distintos à radiação.

Para observação de possíveis alterações estruturais na população de cianobactérias, foi realizado estudo dos mesmos grupos em microscopia eletrônica de transmissão. As análises ultraestruturais associadas a estudos quantitativos mostraram, como principal alteração a redução da proporção de tilacóides. Esta diminuição foi significativamente encontrada em todos os tratamentos, apresentando porcentagens similares nos três grupos. A maior redução da área de tilacóides foi observada após o tratamento com UV-A (94%) seguida pelo tratamento com UV (A+B) (81%) e UV (77%). Esses dados estão em acordo com observação qualitativa anterior mostrando que o tratamento com UV-B, por período de duas horas afeta os tilacóides em cianobactérias do gênero *Synechococcus sp.* (CHAUHAN, *et al.* 1998). A alteração e conseqüente redução destas estruturas também foi observada em organismos fitoplantônicos eucariontes sob efeito da radiação UV-B (LÜTZ, *et al.* 1997, MEINDL e LÜTZ 1996). No entanto, não foram encontrados dados de microscopia eletrônica na literatura avaliando os efeitos dos outros tipos de radiação sobre os tilacóides em cianobactérias.

Outra alteração ultraestrutural observada nitidamente foi a dissociação e a dissolução dos ficobilissomos. Estas estruturas são de grande importância por conterem pigmentos acessórios que auxiliam na captação de luz para a fotossíntese. Trabalhos com marcadores moleculares relatam a dissociação entre os ficobilissomos e a membrana dos tilacóides quando cianobactérias do gênero *Synechococcus* foram expostas à radiação UV (SIX, *et al.* 2007).

A diminuição da produção primária fitoplanctônica causada pela radiação UV, tanto em comunidades naturais quanto em populações específicas, é descrita na literatura (JOINT e JORDAN, 2008, LESSER, 2008, XIANGCHENG, *et al.*, 2007). As evidentes alterações ultraestruturais no aparato fotossintético e em estruturas

acessórias observadas no presente trabalho podem ser consideradas com uma das causas para a ocorrência de tal evento.

Em todos os tratamentos foi observada, em algumas áreas da superfície celular, a perda da distinção entre as três camadas constituintes do envoltório celular. Estas observações corroboram com as altas porcentagens encontradas na quantificação da viabilidade celular, uma vez que o marcador para células não viáveis apenas marca células que apresentam algum dano na membrana plasmática. Alterações de membrana celular podem ser decorrentes da absorção da radiação UV por proteínas de membrana levando à destruição das mesmas e à alteração da integridade do envoltório celular, resultando em morte (SINHA, *et al.* 1996). Estudos futuros deverão avaliar o tipo de morte que está ocorrendo em cianobactéria, como por exemplo, detectar a ocorrência de apoptose, conforme já observado em alga eucarionte da espécie *Chlamydomonas reinhardtii* quando exposta a radiação UV-C (MOHARIKAR, *et al.* 2006).

As análises tanto da densidade e viabilidade celulares como da ultraestrutura mostraram, em conjunto, que o tratamento com UV-A é o mais prejudicial à cepa de *C. raciborskii*. Entretanto esta resposta era esperada para o tratamento UV-B, uma vez que esta radiação é mais energética e acarreta danos diretos ao DNA (MITCHELL e KARENTZ 1993). Os efeitos causados pela radiação UV-B são dependentes do comprimento de onda deste espectro. MEINDL e LUTZ (1996) observaram que danos na morfologia e no desenvolvimento das células de *Micrasterias denticulata* (clorofíceas) por UV-B ocorriam em um pequeno intervalo de tempo quando tratadas com comprimento de onda menor que 275 nm. Os resultados encontrados por esses autores poderiam explicar o baixo efeito da radiação UV-B em nosso experimento, já que a lâmpada usada possui o pico

máximo de emissão no comprimento de onda de 312 nm, que corresponde à área de maior comprimento e menor energia no espectro de radiação UV-B.

Vale ressaltar que o tratamento UV-B, mesmo apresentando um menor efeito letal se comparado aos demais tratamentos, demonstrou ser prejudicial à funcionalidade das células. Tal observação é pertinente uma vez que foi detectado um aumento da radiação UV-B incidente na superfície da Terra e, conseqüentemente, nos ecossistemas aquáticos devido à redução da camada de ozônio (GIES, *et al.* 2009, LEBERT, *et al.* 2002, MARTÁ-NEZ-LOZANO, *et al.* 2009)

Mecanismos de reparação não foram considerados no presente trabalho devido ao curto tempo de tratamento. Tais mecanismos podem agir em questão de horas ou dias após a incidência da radiação UV (GARCIA-PICHEL, *et al.* 1993). A reparação tanto de moléculas de DNA cujas bases foram afetadas, quanto a reparação do aparato fotossintético são estimuladas por UV-A, PAR ou períodos com a ausência de luz (GARDE e CAILLIAU, 2000, GIESKES e BUMA, 1997). Na fotoreativação do DNA, a qual a reparação das bases é dependente de energia proveniente da luz, ocorre a ativação de enzimas que realizam a substituição das bases danificadas por UV-B. No caso do aparato fotossintético, há a reposição de moléculas afetadas devido ao aumento da expressão gênica (CASTENHOLZ e GARCIA-PICHEL 2000).

Há fatores que devem ser considerados em relação à intensidade de radiação ultravioleta incidente em ecossistemas aquáticos naturais. Um destes fatores é a estratificação térmica que promove uma menor concentração de material em suspensão nas camadas mais superficiais da coluna d'água proporcionando, deste modo, a diminuição do processo de absorção da radiação por partículas suspensas (XENOPOULOS, *et al.* 2000) Outro fator são as diferentes concentrações de

carbono orgânico dissolvido na água que geram uma maior absorção e conseqüente aumento da atenuação da radiação UV (MORRIS, *et al.* 1995). A temperatura promove um aumento do metabolismo dos organismos aquáticos permitindo respostas rápidas de mitigação dos efeitos nocivos da radiação UV (HOFFMAN, *et al.* 2003).

A ocorrência de morte celular causada por radiação UV é relatada em comunidades fitoplanctônicas marinhas (LLABRES e AGUSTI 2006). Estes autores mostram que os organismos presentes nas camadas mais superficiais são os mais afetados e apresentam uma alta porcentagem de lise celular. Além disso, foi observada uma diferença de sensibilidade à radiação UV de grupos de cianobactérias coexistentes, demonstrando, deste modo, que o efeito da radiação UV é espécie-específico, podendo ser um importante fator controlador de estrutura de comunidade e sucessão de espécies (QUESADA e VINCENT, 1997, WANGBERG *et al.*, 1996).

O processo de morte celular com conseqüente lise gera a liberação de compostos orgânicos intracelulares, como por exemplo, carbono (LEE e RHEE, 1997). A produção de carbono orgânico dissolvido (COD) através deste processo pode ser de grande importância para cadeia trófica microbiana, na qual o bacterioplâncton assimila o COD e retorna a energia perdida através da lise para os níveis tróficos superiores. No caso de cianobactérias, pode haver liberação de outro composto orgânico o qual pode gerar danos à saúde pública: cianotoxinas (LAM, *et al.* 1995). A liberação destes compostos interfere na qualidade da água gerando intoxicações de populações humanas através de consumo de água contaminada por toxinas produzidas por cianobactérias. Nos seres humanos, as cianotoxinas podem

afetar o fígado (hepatotoxinas), o sistema nervoso (neurotoxinas), a pele (dermatotoxinas) e inibir a síntese protéica (citotoxinas).

A observação e entendimento de processos de morte celular em populações fitoplactônicas causada por radiação UV abrem novas perspectivas sobre a influência deste tipo de radiação em ecossistemas aquáticos e suas conseqüências na persistência de espécies, fluxo energético e ciclos biogeoquímicos.

6. Conclusões

- ✓ O presente estudo mostrou que a cepa CYRF de *C. raciborskii* é sensível à radiação UV, apresentando redução significativa da densidade celular quando exposta à radiação UVA e UV. O tratamento com a radiação UVB, no entanto, não induziu alteração da densidade celular.
- ✓ A utilização do kit backlight mostrou, em paralelo, alteração significativa da viabilidade celular da mesma cepa, demonstrando a ocorrência de processo de morte celular nos 3 tratamentos usados.
- ✓ Análises ultraestruturais mostraram que o aparato fotossintético e os pigmentos acessórios da cepa CYRF de *C. raciborskii* são as estruturas mais afetadas pelos três tipos de radiação.
- ✓ O método de citocentrifugação proporcionou melhor visualização de microorganismos quando comparado ao método usual (filtração) para análise quantitativa de cianobactérias filamentosas em microscopia de fluorescência.
- ✓ Está claro que a radiação UV, principalmente UV-A, é um fator causador de morte e alterações celulares em cepa de *C. raciborskii*. Cabe, em estudos posteriores, o melhor entendimento deste processo e das conseqüências deste fenômeno no fluxo de energia e dinâmica das populações nos ecossistemas aquáticos naturais.

Referências

- ABREU, F., SILVA, K. T., MARTINS, J. L., LINS, U., 2006, "Cell viability in magnetotactic multicellular prokaryotes". *International Microbiology*, v. 9, n. 4, pp. 267-272.
- AGUSTÍ, S., 2004, "Viability and niche segregation of Prochlorococcus and Synechococcus cells across the Central Atlantic Ocean". *Aquatic Microbial Ecology*, v. 36, n. pp. 53–59.
- AGUSTI, S., ALOU, E. V. A., HOYER, M. V., FRAZER, T. K., CANFIELD, D. E., 2006, "Cell death in lake phytoplankton communities". *Freshwater Biology*, v. 51, n. 8, pp. 1496-1506.
- ALLEN, M. M., 1984, "Cyanobacterial Cell Inclusions". *Annual Review of Microbiology*, v. 38, n. 1, pp. 1-25.
- ANDERSON, J. M., 1981, *Ecology for Environmental Science: Biosphere, Ecosystems and Man*. New York, John Wiley & Sons
- BERNEY, M. H., FREDERIK; BOSSHARD, FRANZISKA; WEILENMANN, HANS-ULRICH AND EGLI, THOMAS, 2007, "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, pp. 8.
- BLOMQUIST, P., PETTERSSON, A., HYENSTRAND, P., 1994, "Ammonium-nitrogen: a key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing Cyanobacteria in aquatic systems.". *Archiv für Hydrobiologie*, v. 132, n. pp. 141-164.
- BOOTH, B. C., 1993, "Estimating cell concentration and biomass of autotrophic plankton using microscopy". In: KEMP, P. F., SHERR, B., SHERR, E. B., COLE, J. J. (ed.), *Handbook of Methods Aquatic Microbial Ecology*, 24, Boca Raton, Lewis Publishers
- BOULOS, L., PREVOST, M., BARBEAU, B., COALLIER, J., DESJARDINS, R., 1999, "LIVE/DEAD (R) BacLight (TM): 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, pp. 77-86.
- BOUVY, M. F., DIOGO, MARINHO, M., PAGANO, M., MOURA, A., 2000, "Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought". *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, v. 23, n. 13, pp. 15.
- BRANCO, C., SENNA, P., 1994, "Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoa Reservoir, Brasilia, Brazil ". *Archiv fuer Hydrobiologie, Supplement*, v., n. pp.

BRUSSAARD, C. P. D., 2004, "Viral Control of Phytoplankton Populations—a Review". *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 51, n. 2, pp. 125-138.

CASAMATTA, D. A., JOHANSEN, J. R., VIS, M. L., BROADWATER, S. T., 2005, "Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria)". *Journal of Phycology*, v. 41, n. 2, pp. 421-438.

CASTENHOLZ, R. W., GARCIA-PICHEL, F., 2000, "Cyanobacterial responses to UV radiation". In: WHITTON, B. A., POTTS, M. (ed.), *The Ecology of Cyanobacteria*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers

CHAPMAN, A. D., SCHELSKE, C. L., 1997, "Recent appearance of *Cylindrospermopsis* (cyanobacteria) in five hypereutrophic Florida lakes". *Journal of Phycology*, v. 33, n. 2, pp. 191-195.

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

CHORUS, I., BARTRAM, J., 1999, *Toxic Cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London, Taylor & Francis

CRUTZEN, P. J., 1992, "Ultraviolet on the increase". *Nature*, v. 356, n. 6365, pp. 104-105.

D'AVILA, H., MELO, R. C., PARREIRA, G. G., WERNECK-BARROSO, E., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., BOZZA, P. T., 2006, "Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo". *J Immunol*, v. 176, n. 5, pp. 3087-3097.

DARZYNKIEWICZ, Z., LI, X., GONG, J., 1994, "Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis.". *Methods Cell Biology*, v. 41, n. pp. 15-38.

DAY, T. A., NEALE, P. J., 2002, "Effects of UV-B radiation on terrestrial and aquatic primary producers". *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 33, n. pp. 371-396.

DOKULIL, M. T., MAYER, J., 1996, "Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis* : *Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria". *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband, Algological studies*, v. 117, n. pp. 179-195.

DONKOR, V. A., HADER, D.-P., 1997, " Ultraviolet radiation effects on pigmentation in the cyanobacterium *Phormidium uncinatum*". *Acta Protozoologica*, v. 36, n. 1, pp. 49 - 55.

DONKOR, V. A., HADER, D. P., 1996, "Effects of ultraviolet irradiation on photosynthetic pigments in some filamentous cyanobacteria". *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, v. 11, n. 7, pp. 143-149.

ELLIS, R. E., YUAN, J., HORVITZ, H. R., 1991, "Mechanisms and Functions of Cell Death". *Annual Review of Cell Biology*, v. 7, n. 1, pp. 663-698.

FALCON, L. I., LINDVALL, S., BAUER, K., BERGMAN, B., CARPENTER, E. J., 2004, "Ultrastructure of unicellular N₂ fixing cyanobacteria from the Tropical North Atlantic and Subtropical North Pacific Oceans¹". *Journal of Phycology*, v. 40, n. 6, pp. 1074-1078.

FERRÃO-FILHO, A. D. S., SOARES, M. C. S., DE FREITAS MAGALHÃES, V., AZEVEDO, S. M. F. O., 2009, "Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 2, pp. 479-489.

FIJAŁKOWSKA, M., SUROSZ, W., 2005, "THE IMPACT OF UV-B RADIATION ON MICROCYSTIS AERUGINOSA GROWTH AND TOXIN PRODUCTION". *Oceanological and Hydrobiological Studies*, v. 34, n. pp. 55-65.

FRANKLIN, D. J., BRUSSAARD, C. P. D., BERGES, J. A., 2006, "What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology?". *European Journal of Phycology*, v. 41, n. 1, pp. 1-14.

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

GANTT, E., CONTI, S. F., 1969, "Ultrastructure of Blue-Green Algae". *J. Bacteriol.*, v. 97, n. 3, pp. 1486-1493.

GARCIA-PICHEL, F., WINGARD, C. E., CASTENHOLZ, R. W., 1993, "Evidence Regarding the UV Sunscreen Role of a Mycosporine-Like Compound in the Cyanobacterium *Gloeocapsa* sp". *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, n. 1, pp. 170-176.

GIES, P., ROY, C., JAVORNICZKY, J., HENDERSON, S., LEMUS-DESCHAMPS, L., DRISCOLL, C., 2009, "Global Solar UV Index: Australian Measurements, Forecasts and Comparison with the UK". *Photochemistry and Photobiology*, v. 79, n. 1, pp. 32-39.

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. T., KIM, W. K., 1964, "Isolation And Culture Of Toxic Strains Of *Anabaena Flos-Aquae* (Lyngb.) De Breb". *INTERNATIONAL ASSOCIATION OF THEORETICAL AND APPLIED LIMNOLOGY, PROCEEDINGS*, v. 15, n. pp. 796-804.

GROMOV, B. V., GAVRILOVA, O. V., KONOVALOV, E. S., 1986, "Ultrastructure of Cells in Cyanobacteria of the Genus *Cyanothece*". *Microbiology*, v. 55, n. 5, pp. 658-661.

HADER, D. P., KUMAR, H. D., SMITH, R. C., WORREST, R. C., 1998, "Effects on aquatic ecosystems". *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 46, n. 1-3, pp. 53-68.

HERRMANN, H., HÄDER, D. P., KÖFFERLEIN, M., SEIDLITZ, H. K., GHETTI, F., 1996, "Effects of UV radiation on photosynthesis of phytoplankton exposed to solar simulator light". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 34, n. 1, pp. 21-28.

HOFFMAN, J. R., HANSEN, L. J., KLINGER, T., 2003, "Interactions between UV Radiation and temperature limit inferences from single-factor experiments". *Journal of Phycology*, v. 39, n. 2, pp. 268-272.

HUSZAR, V. L. M. S., L. H. S., 1999, "Cinco décadas de estudos sobre a ecologia do fitoplâncton no Brasil.". *Limnotemas*, v. 2, n. pp. 1-22.

IMAI, I., ISHIDA, Y., HATA, Y., 1993, "Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan". *Marine Biology*, v. 116, n. 4, pp. 527-532.

JENSEN, T. E., 1993, "Cyanobacterial Ultrastructure". In: BERNER, T. (ed.), *Ultrastructure of Microalgae*, Boca Raton, CRC Press

JOUX, F. A. L., P., 1997, "Ecological Implications of an Improved Direct Viable Count Method for Aquatic Bacteria". *Appl Environ Microbiol.*, v. 9, n. 63, pp. 3643-3647.

KERR, J. B., MCELROY, C. T., 1993, "Evidence for Large Upward Trends of Ultraviolet-B Radiation Linked to Ozone Depletion". *Science*, v. 262, n. 5136, pp. 1032-1034.

LAM, A. K.-Y., PREPAS, E. E., SPINK, D., HRUDEY, S. E., 1995, "Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health.". *Water Res.*, v. 29, n. pp. 1845-1854.

LEBERT, M., SCHUSTER, M., HÄDER, D.-P., 2002, "The European Light Dosimeter Network: four years of measurements". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 66, n. 1, pp. 81-87.

LEE, D.-Y., RHEE, G. Y., 1997, "Kinetics of cell death in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* and the production of dissolved organic carbon". *Journal of Phycology*, v. 33, n. 6, pp. 991-998.

LEE, D.-Y., RHEE, G. Y., 1999a, "Circadian rhythm in growth and death of *Anabaena flos-aquae* (Cyanobacteria)". *Journal of Phycology*, v. 35, n. 4, pp. 694-699.

LEE, D. Y., RHEE, G. Y., 1999b, "Kinetics of growth and death in *Anabaena flos-aquae* (cyanobacteria) under light limitation and supersaturation". *Journal of Phycology*, v. 35, n. 4, pp. 700-709.

LLABRES, M., AGUSTI, S., 2006, "Picophytoplankton cell death induced by UV radiation: Evidence for oceanic Atlantic communities". *Limnology and Oceanography*, v. 51, n. 1, pp. 21-29.

LÜTZ, C., SEIDLITZ, H. K., MEINDL, U., 1997, "Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation". *Plant Ecology*, v. 128, n. 1, pp. 55-64.

MADRONICH, S., 1992, "Implications of recent total atmospheric ozone measurements for biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface". *Geophys. Res. Lett.*, v. 19, n. pp.

MAGALHÃES, V. F., AZEVEDO, S. M. F. O., 1998, *Ecological implications of hepatotoxic *Microcystis aeruginosa* in the Jacarepaguá Lagoon, Brazil*. Junta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco

MARTÃ-NEZ-LOZANO, J. A., MARÃ-N, M. A. J., TENA, F., UTRILLAS, M. A. P., SÃ-NCHEZ-MUNIOGUREN, L., GONZÃ-LEZ-FRÃ-AS, C., CUEVAS, E., REDONDAS, A., LORENTE, J. N., DE CABO, X., CACHORRO, V., VERGAZ, R., DE FRUTOS, A., DÃ-AZ, J. P., EXPÃ-SITO, F. J., DE LA MORENA, B., VILAPLANA, J. M., 2009, "UV Index Experimental Values During the Years 2000 and 2001 from the Spanish Broadband UV-B Radiometric Network". *Photochemistry and Photobiology*, v. 76, n. 2, pp. 181-187.

MEINDL, U., LÜTZ, C., 1996, "Effects of UV irradiation on cell development and ultrastructure of the green alga *Micrasterias*". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 36, n. 3, pp. 285-292.

MELO, R. C., PEREZ, S. A., SPENCER, L. A., DVORAK, A. M., WELLER, P. F., 2005, "Intrgranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils". *Traffic*, v. 6, n. 10, pp. 866-879.

MELO, R. C., FABRINO, D. L., DIAS, F. F., PARREIRA, G. G., 2006, "Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity". *Inflamm Res*, v. 55, n. 8, pp. 342-348.

MELO, R. C. N., ROSA, P. G., NOYMA, N. P., PEREIRA, W. F., TAVARES, L. E. R., PARREIRA, G. G., CHIARINI-GARCIA, H., ROLAND, F., 2007, "Histological approaches for high-quality imaging of zooplanktonic organisms". *Micron*, v. 38, n. 7, pp. 714-721.

MITCHELL, D. L., KARENTZ, D., 1993, "The induction and repair of DNA photodamage in the environment". In: YOUNG, A. R., BJÖRN, L., MOAN, J., NULTSCH, W. (ed.), *Environmental UV Photobiology*, New York, Plenum

MOHARIKAR, S., D'SOUZA, J. S., KULKARNI, A. B., RAO, B. J., 2006, "Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyceae) cells following UV irradiation: detection and functional analyses". *Journal of Phycology*, v. 42, n. 2, pp. 423-433.

MORRIS, D. P., ZAGARESE, H., WILLIAMSON, C. E., BALSEIRO, E. G., HARGREAVES, B. R., MODENUTTI, B., MOELLER, R., QUEIMALINOS, C., 1995, "The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon". *Limnology and Oceanography*, v. 40, n. 8, pp. 1381-1391.

MUR, L. R., SKULBERG, O. M., UTKILEN, H., 1999, "Cyanobacteria in the environment". In: CHORUS, I., BARTRAM, J. (ed.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, 2, London, Taylor and Francis

PADISÁK, J., 1997, "Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology.". *Archiv für Hydrobiologie*, v. 107, n. pp. 563-593.

PALINSKA, K. A., KRUMBEIN, W. E., SCHLEMMINGER, U., 1998, "Ultramorphological studies on Spirulina sp.". *Botanica Marina*, v. 41, n. 4, pp. 349-355.

PEARL, H. W., 2000, "Marine plankton". In: WHITON, B. A., POTTS, M. (ed.), *The ecology of cyanobacteria*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers

PETTERSON, K., HERLITZ, E., ISTVÁNOVICS, V., 1993, "The role of Gloeotrichia echinulata in the transfer of phosphorus from sediments to water in Lake Erken.". *Hydrobiologia*, v. 253, n. pp. 123-129.

RECH, M., MOUGET, J.-L., MORANT-MANCEAU, A., PHILIPPE, R., TREMBLIN, G. R., 2005, "Long-term acclimation to UV radiation: effects on growth, photosynthesis and carbonic anhydrase activity in marine diatoms". *Botanica Marina*, v. 48, n. 5, pp. 407-420.

REYNOLDS, C. S., 1984, *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge, Cambridge University Press

RYLANDER, M. N., DILLER, K. R., WANG, S. H., AGGARWAL, S. J., 2005, "Correlation of HSP70 expression and cell viability following thermal stimulation of bovine aortic endothelial cells". *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*, v. 127, n. 5, pp. 751-757.

SANT'ANNA, C. L., AZEVEDO, M. T. P., AGUJARO, L. F., CARVALHO, M. C., CARVALHO, L. R., SOUZA, R. C. R., 2006, *Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras* Rio de Janeiro, Editora Interciência

SHAFIK, H. M., VÖRÖS, L., SPRÖBER, P., PRÉSING, M., KOVÁCS, A. W., 2003, "Some special morphological features of Cylindrospermopsis raciborskii in batch and continuous cultures". *Hydrobiologia*, v. 506-509, n. 1, pp. 163-167.

SHAPIRO, J., 1990, "Currents beliefs regarding dominance by blue-greens: the case of the importance of CO₂ and pH.". *Verhandlungen des Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, v. 24, n. pp. 38-54.

SINHA, R. P., KUMAR, H. D., KUMAR, A., HADER, D.-P., 1995, "Effects of UVB irradiation on growth, survival, pigmentation and nitrogen metabolism enzymes in cyanobacteria.". *Acta Protozoologica*, v. 34, n. pp. 187-192.

SINHA, R. P., SINGH, N., KUMAR, A., KUMAR, H. D., HIDER, M., HADER, D.-P., 1996, "Effects of UV irradiation on certain physiological and biochemical processes in cyanobacteria". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 32, n. pp. 07-113.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. & ROCHA, O., 2003, *Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de Organismos Aquáticos São Paulo*, Rima/FAPESP

SIX, C., JOUBIN, L., PARTENSKY, F., HOLTZENDORFF, J., GARCZAREK, L., 2007, "UV-induced phycobilisome dismantling in the marine picocyanobacterium *Synechococcus* sp WH8102". *Photosynthesis Research*, v. 92, n. 1, pp. 75-86.

SMITH, V., 1983, "Low nitrogen to phosphorous ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton.". *Science*, v. 221, n. pp. 669-671.

STRUBINSKA, J., 2005, "Lead influence on cell viability and production of reactive oxygen species in sunflower seedlings". *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 27, n. 4, pp. 95-95.

SUTTLE, C. A., 2005, "Viruses in the sea". *Nature*, v. 437, n. 7057, pp. 356-361.

TRIPATHI, R. C., LIN, S., PHILIPS, W., TRIPATHI, B. J., CHALAM, K. V., 2005, "Effects of trypan blue on cell viability and gene expression of retinal ganglion cells". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 46, n. pp. -.

VASSILIEV, I. R., PRASIL, O., WYMAN, K. D., KOLBER, Z., HANSON, A. K., PRENTICE, J. E., FALKOWSKI, P. G., 1994, "Inhibition of PS II photochemistry by PAR and UV radiation in natural phytoplankton communities". *Photosynthesis Research*, v. 42, n. 1, pp. 51-64.

WEATHERHEAD, E. C., ANDERSEN, S. B., 2006, "The search for signs of recovery of the ozone layer". *Nature*, v. 441, n. 7089, pp. 39-45.

WMO, 2003, *Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2002. Global Ozone Research and Monitoring Project*. 47, Geneva

XENOPOULOS, M. A., PRAIRIE, Y. T., BIRD, D. F., 2000, "The influence of UVB, stratospheric ozone variability and thermal stratification on the phytoplankton biomass dynamics in a mesohumic lake". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 57, n. pp. 600-609.