

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

**Thiago Pereira da Silva**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM BACTÉRIAS AQUÁTICAS  
EM DOIS MODELOS DE ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS TROPICAIS**

JUIZ DE FORA  
2012

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

**Thiago Pereira da Silva**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM BACTÉRIAS AQUÁTICAS  
EM DOIS MODELOS DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS TROPICAIS**

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

JUIZ DE FORA  
2012

Silva, Thiago Pereira.

Avaliação do processo de morte celular em bactérias aquáticas em dois modelos de ecossistemas aquáticos tropicais / Thiago Pereira da Silva. – 2012.

96 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Ecossistemas. 2. Morte celular. I. Título.

CDU 574.4/.5

**Thiago Pereira da Silva**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM BACTÉRIAS AQUÁTICAS  
EM DOIS MODELOS DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS TROPICAIS.**

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

---

Prof<sup>a</sup>. Heloísa D'Avila da Silva Bizarro, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

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

À Meus Pais, família e irmãos de sangue e vida,  
Eu dedico este trabalho

## AGRADECIMENTOS

À Deus e as forças geradoras da natureza, por todas as oportunidades oferecidas pela vida.

À minha orientadora, Rossana Melo, pela orientação, apoio e aprendizado sempre proporcionados. E pela confiança e incentivo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Fábio Roland, pela parceria, sugestão de idéias e suporte oferecido pelo laboratório de Ecologia Aquática (LEA) da UFJF no desenvolvimento do projeto.

Ao Nathan, Lucia, Michaela, Anderson, Natália, Gladson e a todos do LEA - UFJF pelas suporte nas coletas e apoio na realização deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Patricia Bozza (Laboratório de Imunofarmacologia) e ao Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, do instituto Oswaldo Cruz (RJ), pela colaboração nos experimentos de citometria de fluxo.

À Lívia Texeira pelo auxílio na utilização do citômetro e à Grazielle Ribeiro, pela imensa ajuda nas análises de fragmentação de DNA.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL, ICB) e Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais e ao Prof. Hélio Chiarini-Garcia pela colaboração nos processamentos de microscopia eletrônica.

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular da UFJF, pelo incentivo e parceria: Lívia, Thabata, Aline, Kátia, Kennedy, Daniel, Felipe, Gabriel, professora Patrícia Elaine e professora Heloísa.

À minha grande amiga Juliana, pela fundamental ajuda no desenvolvimento da pesquisa. Agradeço não somente pelo companheirismo no ambiente acadêmico como também pela amizade e incentivo no meu dia-a-dia.

À Sylvia e Carminha, por abrir meus olhos à novas possibilidades e por me mostrarem “um foco”, quando mais precisava.

À grande amiga de todas as horas, Paty, pela amizade e incentivo.

À todos amigos/irmãos que amo, os deste e os do outro lado, os de perto e os de longe, os presentes e menos presentes, que sempre me amparam carinhosamente.

E finalmente minha família, Pai, Mãe, Raquel, Diogo, Dinda Ana, Vô e Carmem por tudo que sempre fizeram e continuam fazendo. Agradeço pelo incentivo e apoio em todos os momentos, principalmente os mais difíceis.

## Resumo

O bacterioplâncton é um dos componentes da cadeia trófica em ecossistemas aquáticos, sendo regulado por fatores como disponibilidade de nutrientes, temperatura, predação e infecção viral. A morte de bactérias é caracterizada como o processo de perda funcional e morfológica da célula e tem função de controlar a abundância e produção bacteriana, com significado importante na ciclagem de carbono e nutrientes nos ecossistemas aquáticos. No entanto, o processo de morte celular em bactérias aquáticas é desconhecido. Ainda não se sabe se a morte celular programada (MCP), processo regulado e bem conhecido em organismos eucariotos, ocorre em bactérias aquáticas. Este trabalho teve por objetivo investigar a ocorrência de MCP em bactérias aquáticas utilizando dois modelos de ecossistemas: lago Batata e lago dos Manacás. O lago Batata é um ecossistema amazônico de inundação e encontra-se dividido em duas áreas: impactada e natural. O lago dos Manacás é um ecossistema artificial localizado em Minas Gerais. Três grupos de bactérias, provenientes do lago dos Manacás, lago Batata – área natural e lago Batata – área impactada foram estudados. As amostras de água foram coletadas na sub-superfície dos lagos e processadas para análises da viabilidade celular por microscopia de fluorescência e da fragmentação de DNA por citometria de fluxo. Em paralelo, amostras do lago Batata – área impactada foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET) para caracterizar a diversidade ultraestrutural da comunidade bacteriana e investigar a ocorrência de alterações celulares bacterianas. Os resultados da viabilidade celular utilizando marcadores específicos para integridade de membrana (*LIVE/DEAD BacLight*) mostraram diretamente a presença de bactérias vivas/viáveis e mortas/inviáveis. O lago Batata apresentou maior proporção de morte celular bacteriana (36,20%) em comparação com o lago dos Manacás (19,66%). As análises de fragmentação de DNA (ensaio TUNEL) mostraram que a MCP constitui um fenômeno presente nos ecossistemas aquáticos estudados, com maior ocorrência na área impactada do lago Batata. A MET revelou a presença de bactérias aquáticas com grande diversidade ultraestrutural, representada por diferenças morfológicas quanto ao envoltório celular, cápsula, mesossomos, vesículas membranosas, partículas aderidas e tilacóides. Além disso, 34,28% das bactérias apresentavam vírus no citoplasma. A diversidade ultraestrutural pode representar a ampla diversidade metabólica e adaptativa bacteriana, enquanto a presença de vírus parece relacionada com a morte bacteriana. As análises de integridade ultraestrutural mostraram que (i) a maior proporção de bactérias encontrava-se com alterações ultraestruturais indicativas de processo de morte, (ii) a frequência de ocorrência de cápsula foi menor nas bactérias vazias, (iii) bactérias com alterações apresentaram maior frequência de partículas aderidas, e (v) o número médio de fagos por secção foi significativamente maior nas bactérias alteradas em comparação com as bactérias intactas. A MET mostrou a ocorrência de alterações ultraestruturais típicas de MCP, como retração e condensação citoplasmáticas. Em conjunto, nossos dados ressaltam morte bacteriana como um evento importante atuando na regulação da comunidade bacteriana e demonstra, pela primeira vez, a ocorrência de MCP em bactérias aquáticas. A MCP pode ter significado funcional como um dos mecanismos desenvolvidos para sobrevivência da comunidade bacteriana.

Palavras-chave: Bactérias aquáticas. Ecossistemas aquáticos tropicais. Morte celular programada. Fragmentação de DNA. Microscopia eletrônica. Ultraestrutura bacteriana. Apoptose.

## Abstract

The bacterioplankton is an important component of the food web structure in aquatic ecosystems and it is regulated by many factors such as nutrient supply, temperature, predation and virus infection. Bacterial death is characterized by functional and morphological loss of the bacterial cell with roles in the control process of abundance and bacterial production of aquatic ecosystems and functional meaning in the carbon and nutrient cycles. However, the cell death process in aquatic bacteria remains to be defined. Programmed cell death (PCD) is a regulated process largely known in eukaryotic organisms. There are not studies dealing with PCD occurrence in aquatic bacteria. This study aimed to investigate the occurrence of PCD in free-living aquatic bacteria in two models of aquatic ecosystems: Batata lake and Manacás lake. Batata Lake is located on floodplain Trombetas river in northern of Brazilian Amazon. This ecosystem has been impacted for bauxite tailings over teen years and it is presently divided in impacted and natural stations. Manacás Lake is an artificial system located in Minas Gerais. Three groups of bacteria from Manacás Lake, Batata lake – impacted area - and Batata lake – natural area -were studied. Water samples were collected from the subsurface of these lakes and processed for analyses of bacterial viability by fluorescence microscopy and DNA fragmentation by flow citometry. In parallel, samples from Batata lake – impacted area - were processed for transmission electron microscopy (TEM) for characterization of the bacterial community ultrastructural diversity and investigation of bacteria alterations. Our cell viability results using specific markers for membrane integrity (*LIVE/DEAD BacLight*) showed directly the presence of live/viable and dead/ not viable bacteria. Batata lake presented a higher proportion of bacterial death (36,20%) compared to Manacás lake (19,66%). DNA fragmentation analyses (TUNEL assay) showed that PCD is a phenomenon occurring in all aquatic ecosystems investigated, with higher frequency in the Batata lake-impacted area compared to the other ecosystems. Our TEM analyses revealed a great bacterial ultrastructural diversity represented by morphological differences in the cellular envelope, capsule, mesosomes, membrane vesicles, attached particles and thylacoids. Moreover, around 34,28% of the bacteria showed virus in their cytoplasm. The ultrastructural diversity may represent the large metabolic and adaptative diversity of aquatic bacteria while the presence of virus may be related to bacterial death. Our ultrastructural integrity analyses showed that (i) the higher proportion of bacteria was in death process or dead (damaged and empty), (ii) the capsule frequency is lower in empty bacteria, (iii) the higher bacteria-particle association was found in altered bacteria, (iv) the mean number of viruses per cell section was higher in altered compared to intact bacteria. TEM also showed the presence occurrence of typical ultrastructural changes indicative of MPC, such as cell retraction and condensation. Altogether, our data demonstrate that PCD occur in aquatic bacteria, and that this event may be a survival mechanism for bacterial communities in these ecosystems.

Keywords: Aquatic bacteria. Tropical aquatic ecosystems. Programmed cell death. DNA fragmentation. Electron microscopy. Bacterial ultrastructure. Apoptosis.



## Índice de abreviaturas

|                  |   |
|------------------|---|
| AIF              | fator indutor de apoptose                                       |
| BrdUTP           | desoxitimidina 5-bromo-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato            |
| Ca <sup>+2</sup> | cálcio  |
| COD              | Carbono orgânico dissolvido                                     |
| COP              | Carbono orgânico particulado                                    |
| DISC             | complexo indutor e sinalizador de morte                         |
| DNA              | ácido desoxiribonucléico  |
| EROS             | espécies reativas de oxigênio                                   |
| FADD             | Proteína Fas associada com domínio de morte                     |
| IAP              | proteínas inibidoras de apoptose                                |
| LPS              | lipopolissacarídeo  |
| MET              | microscopia eletrônica de transmissão                           |
| MOD              | matéria organica dissolvida                                     |
| MOMP             | permeabilização da membrana mitocondrial                        |
| MCP              | morte celular programada  |
| MRC              | morte celular rápida  |
| NCCD             | Comitê Internacional de Nomenclatura em Morte Celular           |
| PHA              | polihidroxicanoatos   |
| PHB              | polihidroxibutiratos  |
| PPT              | poros de transição da permeabilidade mitocondrial               |
| QS               | quorum sense  |
| RE               | retículo endoplasmático   |
| RNA              | ácido ribonucléico  |
| TA               | modulos geneticos toxina-antitoxina                             |
| TAG              | trigliceróis  |
| TdT              | deoxinucleotidil transferase terminal                           |
| TNF              | fator de necrose tumoral  |
| TRADD            | receptor de fator de necrose tumoral-domínio de morte associado |

## Sumário

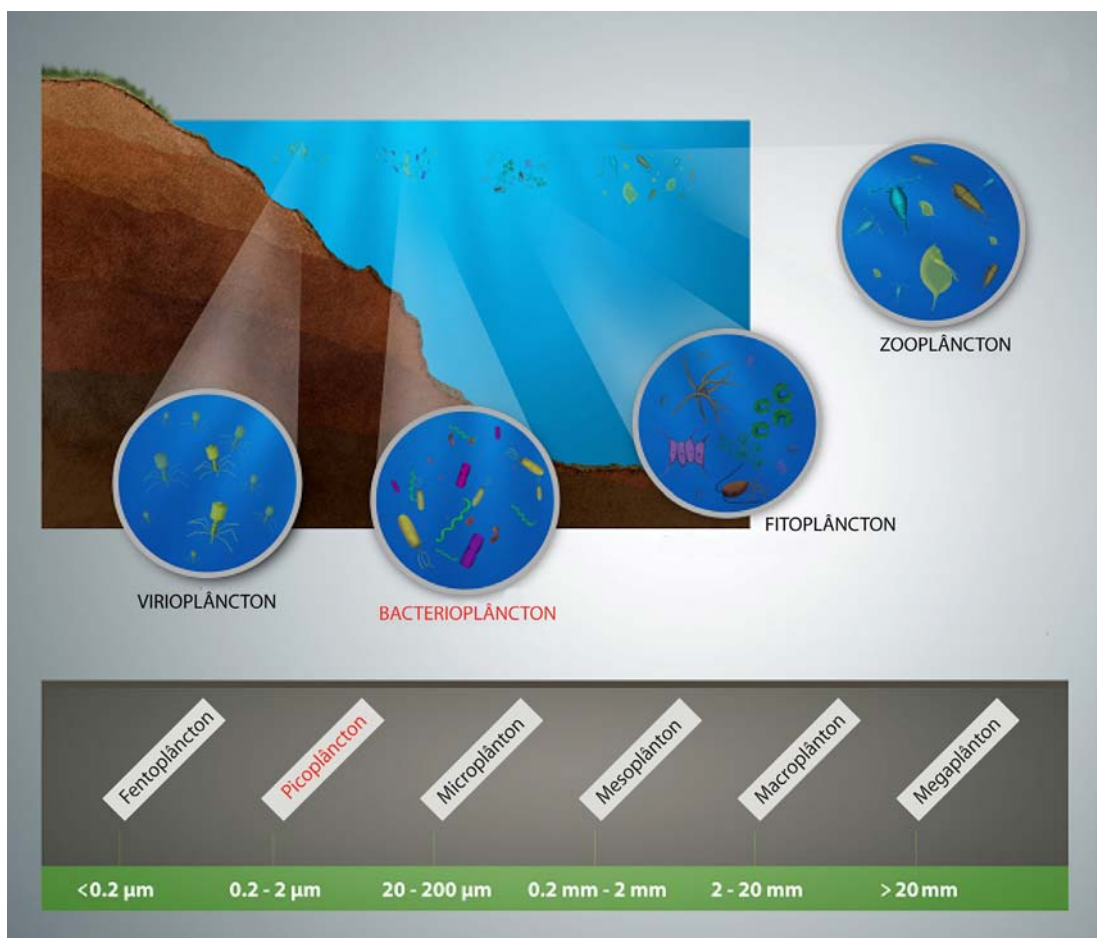
|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | 11 |
| 1.1      | BACTÉRIAS AQUÁTICAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS                             | 11 |
| 1.2      | ULTRAESTRUTURA DE BACTÉRIAS   | 13 |
| 1.2.1    | Membrana Plasmática   | 14 |
| 1.2.2    | Parede Celular  | 14 |
| 1.2.3    | Estruturas Capsulares   | 17 |
| 1.2.4    | Estruturas Citoplasmáticas  | 18 |
| 1.2.5    | Partículas Virais   | 20 |
| 1.3      | MORTE BACTERIANA EM ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS                            | 21 |
| 1.4      | MECANISMOS DE MORTE CELULAR   | 24 |
| 1.4.1    | Considerações Gerais  | 24 |
| 1.4.2    | Morte Celular em Organismos Multicelulares Eucarióticos               | 25 |
| 1.4.2.1  | Apoptose  | 25 |
| 1.4.2.2  | Necrose   | 32 |
| 1.4.2.3  | Morte Celular em Organismos Unicelulares Eucarióticos e Procarióticos | 35 |
| 1.4.3.1  | Papel da MPC em organismos unicelulares e bactérias                   | 35 |
| 1.4.3.2  | Sistema toxina/antitoxina e morte celular programada em bactérias     | 37 |
| 1.4.3.3  | Semelhanças de MPC em eucariotos e bactérias                          | 38 |
| 1.4.3.4  | Significado e complexidade de MCP em bactérias                        | 41 |
| 1.5      | JUSTIFICATIVA   | 42 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>  | 43 |
| 2.1      | OBJETIVO ESPECÍFICO   | 43 |
| 2.2      | OBJETIVOS GERAIS  | 43 |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | 44 |
| 3.1      | OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E ÁREAS DE COLETA                               | 44 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.2      | VIABILIDADE CELULAR  | 46        |
| 3.3      | AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA   | 47        |
| 3.3.1    | Quantificação do Número de Bactérias por Volume de Amostra                 | 47        |
| 3.3.2    | Análise por Citometria de Fluxo  | 48        |
| 3.4      | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)                                | 49        |
| 3.5      | OBTENÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS  | 50        |
| 3.6      | ANÁLISE ESTATÍSTICA  | 50        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b>  | <b>51</b> |
| 4.1      | VIABILIDADE CELULAR  | 51        |
| 4.2      | ANÁLISES DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO                    | 53        |
| 4.3      | ULTRAESTRUTURA   | 57        |
| 4.3.1    | Características Gerais   | 57        |
| 4.3.2    | Integridade Ultraestrutural  | 61        |
| 4.3.2.1  | Integridade ultraestrutural e sua relação com cápsula e partículas do meio | 61        |
| 4.3.2.2  | Partículas virais x integridade ultraestrutural                            | 62        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b>   | <b>68</b> |
| 5.1      | MORTE CELULAR DE BACTÉRIAS DE VIDA LIVRE EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS          | 68        |
| 5.2      | MORTE CELULAR PROGRAMADA EM BACTÉRIAS                                      | 70        |
| 5.3      | ULTRAESTRUTURA DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS                                      | 73        |
| 5.3.1    | Diversidade Ultraestrutural  | 73        |
| 5.3.2    | Integridade Ultraestrutural e Morte Celular                                | 75        |
| 5.4      | CONSIDERAÇÕES FINAIS   | 78        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b>  | <b>80</b> |
|          | <b>Referências</b>   | <b>81</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BACTÉRIAS AQUÁTICAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As bactérias são microrganismos procariotos encontrados nos mais diversos habitats terrestres e aquáticos, ocorrendo inclusive em locais inóspitos, sem oxigênio e com altas temperaturas. Bactérias encontram-se entre os seres vivos mais antigos, colonizando nosso planeta há mais de 3,8 bilhões de anos, sendo mais abundantes nos sistemas aquáticos continentais e marinhos. Estima-se que a abundância destes microrganismos em regiões pelágicas chega a níveis de  $10^2$  a  $10^8$  células/mL (Singee, 2005). A maioria das células bacterianas possui o tamanho entre  $0,2-2\mu\text{m}$  (picoplâncton), porém algumas são menores que  $0,2\mu\text{m}$  (fentoplâncton) e outras conseguem chegar ao tamanho do nanoplâncton ( $2-20\mu\text{m}$ ) (Fig. 1).



**Figura 1 - Classificação planctônica baseada no nicho ecológico e classe de tamanho.** Em destaque a posição das bactérias (vermelho) no bacterioplâncton, pertencente em escala de tamanho ao picoplâncton. Adaptado de Soares, Lobão *et al.* (2011).

A diversidade metabólica das bactérias é um aspecto importante no ambiente aquático e reflete os seus diferentes papéis no ecossistema. Considerando a obtenção de carbono celular, o metabolismo bacteriano pode ser autotrófico, quando o carbono é obtido pela redução do CO<sub>2</sub> e heterotrófico, quando este é obtido pela redução de outras substâncias orgânicas (Kalff, 2001). As bactérias heterotróficas estão entre os principais grupos de procariontes dos sistemas aquáticos, diferenciando das cianobactérias pela nutrição heterotrófica, ou seja, pela dependência nutricional da matéria orgânica sintetizada por outros organismos (Singee, 2005). Elas ainda podem ser divididas de acordo com a fonte de energia utilizada na oxidação da matéria orgânica em quimiossintetizantes ou fotossintetizantes e pela fonte de elétrons necessária ao crescimento em organotróficas ou litotróficas (Singee, 2005).

O papel de microrganismos dentro da organização trófica teve sua importância reconhecida após o trabalho de Lindeman (1942), sendo as bactérias as primeiras deste grupo a serem consideradas dentro da cadeia trófica microbiana (Pomeroy, Williams *et al.*, 2007). As bactérias têm papel importante no mecanismo de consumo do carbono orgânico dissolvido (COD) e sua transformação em matéria orgânica particulada (COP). Assim o carbono que se encontrava inacessível a alguns outros organismos heterotróficos, é reintroduzido nas teias alimentares. Estima-se que o total de carbono celular dos procariontes em todo globo terrestre seja de 3,5 a 5,5 x 10<sup>17</sup>g, correspondendo a cerca de 60% do carbono estimado para plantas (Whitman, Coleman *et al.*, 1998), o que mostra a importância dos microrganismos no ciclo e estoque deste elemento nos ecossistemas. Pomeroy (1974) e, posteriormente Azam, Fenchel *et al.* (1983) propuseram a existência de vários níveis tróficos (bactérias, flagelados e ciliados) dentro da cadeia microbiana, a chamada de alça microbiana, delineando as implicações desta, além dos ciclos biogeoquímicos.

Esta alça destaca o papel das bactérias na absorção e recuperação de matéria orgânica dissolvida e na transferência para níveis superiores, sendo uma via importante de fluxo de energia e ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos (Azam, Fenchel *et al.*, 1983).

O bacterioplâncton é controlado por diversos fatores que atuam em conjunto, como: (i) qualidade e disponibilidade do substrato orgânico, o qual atua no

crescimento e respiração bacteriana (Del Giorgio e Cole, 1998), (ii) disponibilidade de nutrientes, que influenciam no crescimento bacteriano e suas interações com outros organismos, (iii) temperatura, que regula diretamente seu metabolismo, (iv) predação por protozoários e metazoários, além da (v) infecção por vírus (Fuhrman, 1999), que é responsável por significativa lise celular, e liberação de componentes ricos em carbono, fósforo e nitrogênio à outras bactérias.

A vida bacteriana nos ecossistemas aquáticos é repleta de mudanças nas propriedades físico-químicas de seu meio circundante. Em ambientes onde ocorrem rápidas variações espaço-temporais, as bactérias precisam responder eficientemente a estas flutuações, o que envolve adaptações fisiológicas para suportar períodos de redução de matéria orgânica e energia (Grossart e Tang, 2010)

## 1.2 ULTRAESTRUTURA DE BACTÉRIAS

A ultraestrutura bacteriana começou a ser estudada em maiores detalhes nas décadas de 50 e 60, a partir do melhoramento das técnicas de microscopia eletrônica. Estas técnicas possibilitaram uma análise mais refinada da organização bacteriana e têm revelado que as bactérias constituem células com estruturas bem definidas e com nível de organização elevado (Hoppert e Mayer, 1999).

Na célula bacteriana, a membrana plasmática envolve o citoplasma, o qual contém uma variedade de macromoléculas complexas e agrupamentos moleculares de massa molecular variável, poucas moléculas solúveis e água. Porções das células que são estruturalmente e bioquimicamente separadas do resto do citoplasma são consideradas como compartimentos da célula bacteriana (Hoppert e Mayer, 1999).

De maneira geral, as bactérias apresentam membrana plasmática e parede celular delimitando o citoplasma, onde são encontradas diversas estruturas, como ribossomos, mesossomos, nucleóides e alguns grânulos. A parede celular mantém o formato celular e protege contra a lise osmótica. Algumas bactérias podem apresentar flagelos, além de camadas capsulares externas à parede celular. As características ultraestruturais dos componentes bacterianos, assim como suas atividades funcionais, encontram-se descritos abaixo.

### 1.2.1 Membrana Plasmática

A membrana plasmática delimita o citoplasma tanto em células procarióticas, quanto em células eucarióticas. Quando observada pela microscopia eletrônica de transmissão (MET), a membrana plasmática de bactérias apresenta-se com aspecto clássico trilaminar idêntico ao das células eucarióticas, ou seja, uma bicamada de lipídios assimétricos com uma extremidade polar e outra apolar, possuindo proteínas que podem ser periféricas ou integrais. No entanto, a maioria das membranas bacterianas difere das eucarióticas pela ausência de esteróis. Ressalta-se, porém, que algumas bactérias contêm membranas plasmáticas com moléculas semelhantes sintetizadas pelos mesmos precursores dos esteróis, os chamados hopanóides (Prescott, Harley *et al.*, 2002). Muitas proteínas de membrana estão envolvidas nas funções de produção de energia, biossíntese de lipídeos, secreção e transporte de proteínas (Silhavy, Kahne *et al.*, 2010).

A manutenção da integridade da membrana celular é vital para as células bacterianas, pois ela atua na permeabilidade de solutos, é responsável pela manutenção energética das células, por transdução de sinais ou outros processos mediados que produzem energia, além de manter a turgescência celular (Sikkema, De Bonte *et al.*, 1995). A perda da integridade de membrana é geralmente irreversível, denotando inviabilidade ou morte da célula.

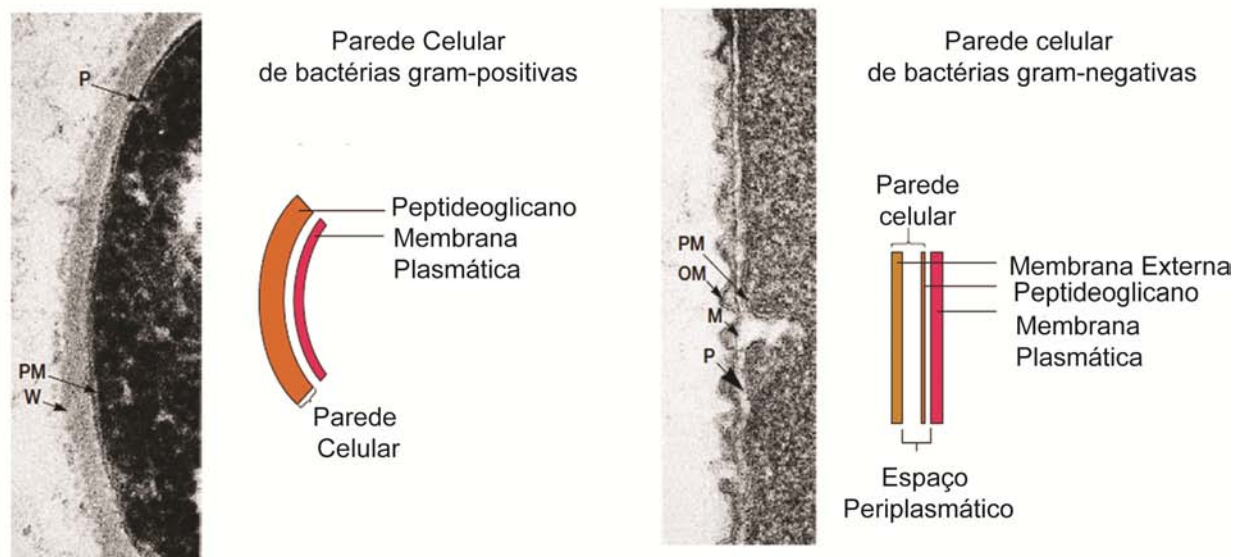
### 1.2.2 Parede Celular

Em 1884, Hans Christian Gram distinguiu duas grandes classes de bactérias, denominadas gram-positivas e gram-negativas, baseado na retenção do corante cristal de violeta. Com o desenvolvimento da microscopia eletrônica e técnicas bioquímicas dos componentes celulares, foi verificado que este fato se deve à diferenças na composição e estrutura da parede celular. A força e a rigidez conferida pela parede celular tanto em gram-positivas quanto em gram-negativas é resultado de um compartimento de peptídeoglicanos, uma estrutura macromolecular rígida, ligada por pontes peptídicas (Cabeen e Jacobs-Wagner, 2005). O compartimento peptídeoglicano encontra-se também associado à resistência a peptídeos antibacterianos e aderência a substratos.

Bactérias gram-positivas apresentam parede celular espessa (20 a 80nm) composta basicamente por uma camada de peptídeoglicanos, que se dispõe em uma ou várias subcamadas (Fig. 2). Dentre estas camadas, podem ser encontrados os ácidos teóicos e lipoprotéicos (Prescott, Harley *et al.*, 2002). Os ácidos teóicos são carboidratos presentes na parede celular das bactérias gram-positivas e apresentam duas formas moleculares básicas, os ácidos teóicos de parede que são unidos ao peptídeoglicano por ligações covalentes e os ácidos lipoproteicos que estão ancorados na membrana plasmática. De forma geral, os ácidos teóicos formam um gel polianiônico que tem papel na homeostase de cátions, selecionando o fluxo de íons, nutrientes e proteínas entre a membrana plasmática e o meio externo (Neuhaus e Baddiley, 2003).

Bactérias gram-negativas possuem parede celular mais complexa (Fig. 2). Ela é formada por uma fina camada de peptídeoglicanos (2 a 7nm) cercada por uma membrana externa. Frequentemente, à microscopia eletrônica de transmissão, é observado um espaço entre a membrana plasmática e a membrana externa nas bactérias gram-negativas, e às vezes um espaço similar, porém menor entre a membrana plasmática e a parede celular nas gram-positivas. Este espaço é chamado de espaço periplasmático, ocupado pelo periplasma (Prescott, Harley *et al.*, 2002), preenchido por proteínas e é mais viscoso que o citoplasma. Esta compartimentalização permite que bactérias gram-negativas possam seqüestrar enzimas de degradação potencialmente prejudiciais, tais como RNase ou fosfatase alcalina. Outras proteínas que habitam este compartimento incluem proteínas periplasmáticas de ligação, as quais atuam no transporte e quimiotaxia de aminoácidos e açúcares, e moléculas semelhantes às chaperonas, que atuam na biogênese do envoltório celular (Erhmann, 2007) e autolisinas, enzimas de degradação que auxiliam no crescimento bacteriano, ajudando na clivagem e constituição da camada de peptídeoglicanos (Shockman, Daneo-Moore *et al.*, 1996).





**Figura 2 - Parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas.** Micrografias eletrônicas de envoltório gram-positivo de *Bacillus licheniformis* (esquerda), e gram-negativo de *Aquaspirillum serpens* (direita). M; peptidoglicano ou mureína, OM, membrana externa; PM, membrana plasmática; P, espaço periplasmático; W, parede celular. Adaptado de Prescott, Harley *et al.* (2002).

A membrana externa das bactérias gram-negativas, como as outras membranas biológicas é composta por uma bicamada lipídica, porém os fosfolipídios só são encontrados na porção interna desta membrana. A porção externa da membrana externa é composta de glicolipídeos, principalmente glicopolissacarídeos (LPS). O LPS em bactérias patogênicas sensibiliza o sistema imune, por ser indicador de infecção. A membrana externa possui proteínas com lipídeos ancorados na porção interna da membrana e quase todas as proteínas transmembrana atuam no transporte de solutos (Silhavy, Kahne *et al.*, 2010). A membrana externa pode produzir vesículas que são secretadas para o meio exterior e contém constituintes do periplasma, da parede celular, LPS, fosfolipídios, moléculas de comunicação célula-célula, autolisinas e possivelmente podem conter componentes citoplasmáticos, incluindo DNA (Kulp e Kuehn, 2010). Estas vesículas membranosas carregam enzimas de degradação (Mcbroom e Kuehn, 2007) que auxiliam na formação da parede celular, e que podem ser endereçadas a lise de outras bactérias (Thompson, Naidu *et al.*, 1985). Podem conter substâncias que favorecem a formação de biofilmes (Schooling e Beveridge, 2006), auxiliam na aquisição de nutrientes, aumentam a virulência em bactérias patogênicas, inibem

compostos tóxicos do meio e aumentam a resistência à lise viral (Kulp e Kuehn, 2010).

A estrutura da parede celular permite adaptações fisiológicas a condições do meio circundante. Muitas bactérias aquáticas gram-positivas em circunstâncias ambientais desfavoráveis tendem a formar esporos de dormência. Ocorre, assim, modificação na estrutura celular que possibilita sua sobrevivência durante períodos de escassez de nutrientes. Já bactérias gram-negativas têm mecanismos moleculares e fisiológicos que as permitem persistir em baixa atividade metabólica (Singee, 2005).

### 1.2.3 Estruturas Capsulares

Bactérias e outros microorganismos produzem uma gama de substâncias poliméricas extracelulares composta de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outras macromoléculas biológicas (Wingender, Neu *et al.*, 1999).

Quando estas substâncias se acumulam na superfície das células dos microorganismos, uma matriz geralmente caracterizada por altos níveis de teor de água e de polissacarídeos e de alta viscosidade é formada. Estes exopolímeros acumulados próximos ou anexos a parede celular são classificados como cápsulas, bainhas ou camada limosa (Beveridge e Graham, 1991). Quando ligado à superfície externa, exopolímeros são referidos como cápsula ou, se derramado no meio, são referidos como camada limosa (Benson, 1998). Estes polissacarídeos capsulares são produzidos pelas células em resposta a condições ambientais, e quando presentes formam estruturas periféricas que mediam interações entre as células e o ambiente. Estas cápsulas consistem de polissacarídeos de alto peso molecular. A cápsula bacteriana apresenta várias funções, dentre elas absorção de nutrientes e proteção contra predadores. Além disso, tem papel fundamental na formação de biofilmes, fornece uma rede polimérica para estocagem de nutrientes ou retenção de agentes tóxicos, e previne a dissecação por baixa umidade (Nichols, Guezennec *et al.*, 2005; Stukalov, Korenevsky *et al.*, 2008).

O conjunto formado pela membrana plasmática, parede celular e estruturas capsulares é comumente chamado de envoltório celular, o qual possui funções na proteção e adaptação destes microorganismos (Silhavy, Kahne *et al.*, 2010).

Heissenberger, Leppard *et al.* (1996) relacionam a integridade de estruturas internas e a espessura de estruturas capsulares extracelulares, com o nível de atividade e viabilidade celular em bactérias aquáticas.

#### 1.2.4 Estruturas Citoplasmáticas

A matriz citoplasmática bacteriana é basicamente formada por água (em torno de 70%), e muitas vezes repleta de ribossomos. Os ribossomos nas bactérias são semelhantes aos encontrados em células eucarióticas, porém são menores em tamanho (15nm-20nm) (Prescott, Harley *et al.*, 2002).

As células bacterianas têm uma organização sub-celular complexa que é estabelecida e mantida por um conjunto diversificado de proteínas polimerizadoras que compõe o citoesqueleto. O citoesqueleto bacteriano é composto por várias famílias de proteínas homologas às tubulinas (FtsZ, BtubA/BtubB TubZ e RepX), actinas (MreB, ParM, AlfA, MamK e Fts A) e filamentos intermediários (crescentina)(Pogliano, 2008) e diversas outras proteínas acessórias. O citoesqueleto encontra-se envolvido em várias funções celulares, dentre elas a divisão celular, manutenção do formato, posição das organelas, replicação de plasmídios e segregação do DNA (Shih e Rothfield, 2006; Pogliano, 2008).

Células procarióticas não contêm sistemas de membranas complexas formando organelas. Fitz-James (1960) descreveu mesossomos como a única estrutura membranosa em bacilos gram-positivos. Reavely e Burge (1972) definiu esta estrutura como invaginações da membrana plasmática em forma de sacos tubulares, vesiculares ou lamelares. Os mesossomos encontram-se envolvidos em vários processos celulares fundamentais, incluindo a replicação e segregação dos cromossomos, divisão celular, formação de endósporo e transporte de algumas enzimas. A formação de mesossomos pode ser induzida pelos processos de fixação e tratamentos com altas concentrações de glicerol (Higgins, Tsien *et al.*, 1976).

Bactérias fotossintéticas, nitrificantes e cianobactérias apresentam extensas áreas de membranas intracitoplasmáticas, chamadas de tilacóides, que podem ser tubulares, vesiculares ou lamelares. Estas áreas extras de membrana servem para aumentar a superfície de reações enzimáticas para processos metabólicos (Yurkov e

Beatty, 1998), como a fotossíntese. Recentemente foi demonstrado que os tilacóides podem ser afetados pela irradiação ultravioleta (UV) em cianobactérias. O estudo de Noyma, Melo *et al.* (2009) demonstrou que a radiação UV em *Cylindrospermopsis raciborskii* é fator causador de morte e alterações ultraestruturais que incluem a perda de integridade do envoltório celular e diminuição da área ocupada por tilacóides.

Uma variedade de grânulos citoplasmáticos, denominados também de inclusões citoplasmáticas, são encontrados em bactérias (Shively, 1974). Estes grânulos geralmente servem para estocagem de compostos orgânicos e inorgânicos e também para reduzir a pressão osmótica, pois as moléculas ficam em sua forma particulada. A ocorrência e frequência de grânulos citoplasmáticos são específicas para cada espécie bacteriana (Hoppert e Mayer, 1999). A maioria de grânulos de estocagem em procariontes acumula glicogênio e polifosfatos, como polihidroxiacetatos (PHA) e polihidroxiacanoatos (PHA), porém uns poucos gêneros podem acumular lipídios neutros como trigliceróis (TAG). Em bactérias, grânulos de glicogênio e PHB são reservatórios de carbono, mais comumente encontrados em bactérias, e provêm material para energia e biossíntese celular (Prescott, Harley *et al.*, 2002). A deposição de grânulos de PHA em bactérias normalmente ocorre em resposta a um excesso de substrato carbônico e uma deficiência de outros nutrientes, como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio (Anderson e Dawes, 1990; Steinbuchel, Aerts *et al.*, 1995). Somente alguns gêneros bacterianos, incluindo *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Streptomyces* apresentam grânulos de TAG (Olukoshi e Packter, 1994; Alvarez, Mayer *et al.*, 1996; Alvarez e Steinbuchel, 2002). A estocagem de grânulos de PHA e TAG em bactérias é feita em corpúsculos lipídicos, conhecidos também como inclusões lipídicas ou gotas lipídicas. Estas estruturas encontram-se presentes na maioria dos organismos eucariotes, sendo organelas dinâmicas ricas em triglicerídeos e colesterol, cercadas por uma camada de fosfolípidos. Desempenham uma variedade de funções fisiológicas em vários tipos celulares, possuindo papel importante nas células inflamatórias (Melo, D'ávila *et al.*, 2011). Em bactérias desempenham papéis importantes no metabolismo de lipídeos (Murphy, 2001). Os corpúsculos lipídicos bacterianos consistem gotas arredondadas, constituídas de um núcleo hidrofóbico de PHA ou TAG, delimitada

por uma monocamada externa de fosfolípidos e proteínas distintas, denominadas fasinas (Steinbuchel, Aerts *et al.*, 1995; Murphy, 2001).

A cromatina procariótica está localizada em uma região de formato irregular chamada nucleóide. Geralmente procariotos contêm um círculo único de fita dupla de ácido dextrorribonucleico (DNA), mas alguns possuem DNA cromossômico lineares. À microscopia eletrônica de transmissão, pode-se observar que o DNA bacteriano está em contato com a membrana plasmática ou mesossomos (Prescott, Harley *et al.*, 2002; Eltsov e Zuber, 2006). Algumas bactérias apresentam além do DNA cromossômico uma porção de DNA circular, chamada plasmídeo. Os plasmídeos possuem genes relacionados com diferentes habilidades metabólicas, confere bactéria maior patogenicidade e resistência a drogas, dentre outras propriedades.

Grupos de bactérias apresentam mobilidades distintas. Algumas são completamente imóveis, locomovendo-se de acordo com os fluxos de propulsão do meio. Bactérias móveis possuem apêndices locomotores localizados na face externa da membrana plasmática e parede celular. Os flagelos são estruturas longas, delgadas e relativamente rígidas, apresentando cerca de 20nm de espessura e 15 a 20µm de comprimento, sendo responsáveis pela locomoção das bactérias. Ultraestruturalmente, cada flagelo pode ser subdividido em três regiões: o corpo basal, o qual fica ancorado na célula, o filamento que é formado pela proteína flagelina e se projeta para o meio extracelular e o gancho, que liga o filamento ao corpo basal. O filamento e o gancho são estruturas importantes para a inserção e movimento do filamento (Prescott, Harley *et al.*, 2002).

#### 1.2.5 Partículas Virais

Outra observação freqüente em análises ultraestruturais de bactérias é a presença de partículas virais. Os vírus são as menores entidades biológicas conhecidas e parasitos intracelulares obrigatórios, que podem infectar células procarióticas e eucarióticas. Quando infectam bactérias, os vírus são chamados bacteriófagos. Bradley (1967) descreve a ultraestrutura dos vírus bacteriófagos que apresentam uma estrutura biológica relativamente simples, basicamente um ácido nucléico, ácido ribonucleico (RNA) ou DNA (com uma ou duas bandas) envolto por uma cápsula de proteína. Os bacteriófagos apresentam ciclos de vida diversos

desde a infecção, durante o período de latência, dentro do hospedeiro, até a lise celular. Após a infecção, o genoma viral pode passar a fazer parte do genoma da célula hospedeira e acompanhar o desenvolvimento e a duplicação celular, sem que haja a lise da célula hospedeira (ciclo lisogênico). Ou, em outra perspectiva, o vírus podem atacar a célula hospedeira e injetar o seu conteúdo genético dentro desta célula, passando a dirigir a célula infectada e multiplicam-se, até quando são liberados para o meio extracelular após o rompimento da célula hospedeira (ciclo lítico) reiniciando o ciclo novamente, propagando a infecção para outras células. Perturbações na célula hospedeira podem fazer com que o ciclo lisogênico se transforme em um ciclo lítico (Weinbauer, 2004).

Os vírus são os componentes mais abundantes e dinâmicos do ecossistema aquático. Grande parte do fluxo de matéria e energia da cadeia trófica passa pelos vírus, por meio da matéria orgânica dissolvida (MOD) (Proctor e Fuhrman, 1990). Os vírus são agente significativa no controle de bactérias sendo responsável por 40% da mortalidade bacteriana (Fuhrman e Noble, 1995; Weinbauer, 2004). Trabalho recente utilizando MET associadas a outras técnicas de quantificação viral demonstrou que em ecossistemas aquáticos tropicais, a maioria dos vírus são bacteriófagos e sua abundância é controlada pela disponibilidade de bactérias hospedeiras específicas, que por sua vez são reguladas por outros fatores ambientais, como disponibilidade de nutrientes e qualidade do substrato (Barros, Farjalla *et al.*, 2010).

### 1.3 MORTE BACTERIANA EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

A morte é uma parte do ciclo de vida, e para bactérias essa prerrogativa não é diferente. A abundância aparentemente constante de bactérias de vida livre na maioria dos ambientes aquáticos, em contraste com sua alta taxa de crescimento, sugere que ocorre uma alta taxa de mortalidade entre elas (Grossart e Tang, 2010). A vida bacteriana é geralmente caracterizada por: (i) presença de estruturas, (ii) mudança na informação genética, (iii) metabolismo ou atividade funcional, (iv) viabilidade de reprodução e crescimento (Nebe-Von Caron e Badley, 1995). A mortalidade é referida por Servais, Billen *et al.* (1985) como um processo de perda funcional e morfológica da integridade bacteriana, incluindo lise e destruição do

material genético. Fatores regulatórios de mortalidade em bactérias aquáticas de vida livre esta em maior parte relacionada à predação, disponibilidade de nutrientes, infecção viral ou tipos variados de estresses ambientais.

A mortalidade de bactérias tem o papel de regular a abundância e a produção secundária bacteriana nos ecossistemas aquáticos. Grande quantidade de compostos celulares é degradada depois da morte celular (Novitsky, 1986), sendo incorporados ao carbono orgânico dissolvido. Com a lise bacteriana, no caso de infecção viral, por exemplo, há a liberação de carbono orgânico dissolvido, que ocorre durante o rompimento das células, favorecendo crescimento da população bacteriana (Fuhrman, 1999). Bactérias mortas e suas estruturas podem permanecer enzimaticamente ativas. Estas enzimas proteolíticas podem catalisar reações que disponibilizam um pool de monômeros facilmente utilizáveis para novas gerações (Kiersztyn, Siuda *et al.*, 2011). Portanto a morte de bactérias representa significativa consideração na ciclagem de nutrientes no ecossistema aquático (Lindeman, 1942; Fuhrman, 1999; Pomeroy, Williams *et al.*, 2007).

Os estudos tratando de vida e morte de bactérias do ponto de vista ecológico em ecossistemas aquáticos levam em conta principalmente a viabilidade celular. A viabilidade de bactérias aquáticas mostra-se dependente de diferentes fatores, principalmente entre a contínua mudança entre ativação e limitação de processos celulares. Diferentes níveis de viabilidade podem ser distinguidos à nível unicelular. Smith e Del Giorgio (2003), questionam a validade de restringir os estado fisiológico do bacterioplâncton a tal categoria de ativo ou inativo, propondo que eles seriam um ponto de visão entre o contínuo de estados fisiológicos. Do ponto de vista ecológico, podem ser definidos de acordo com a viabilidade: bactérias ativas respirando, responsáveis pela produção e participação ativa nos ciclos biogeoquímicos; bactérias vivas com parede celular intacta, que mantêm seu metabolismo completo e bactérias mortas (Choi, Sherr *et al.*, 1999).

Uma característica fundamental das células é sua habilidade de regular crescimento em resposta a mudança de condições ambientais. A heterogeneidade em ecossistemas aquáticos pode conduzir as bactérias a se adaptarem fisiologicamente a estas mudanças para maximizar seu crescimento e sobrevivência. Além disso, esta heterogeneidade pode criar uma ampla diversidade espaço-temporal em diferentes estados fisiológicos, o que pode ser uma vantagem seletiva.

Não há dúvida de que, pelo menos algumas espécies de bactérias, são extremamente bem adaptadas para a sobrevivência a longo prazo. Na assembléia bacteriana, sub-populações de bactérias altamente ativas podem conviver com bactérias em baixa atividade ou inativas. Os fatores de ativação ou inativação são dirigidos pelo crescimento ambiental. No geral, fatores físicos modelam o sistema global favorecendo certos grupos de bactérias. Fatores químicos são determinantes na base alimentar, onde bactérias podem crescer exponencialmente. Fatores biológicos funcionam mais como fatores de abundância decrescente de competição de recursos. A diversidade coexiste em assembléias naturais e o fato das bactérias não serem favorecidas em sua totalidade pelas mesmas condições, resultam em diferentes taxas de crescimento (Ducklow, 2000).

A integridade de membrana é um aspecto da estrutura e fisiologia celular. Este é o melhor critério aceito para distinguir entre células vivas e mortas, assumindo que células com dano na membrana não podem sustentar um gradiente eletroquímico e não estão aptas ao crescimento (reprodução). A perda da integridade de membrana representa dano significativo para a célula em múltiplas funções ligadas à membrana plasmática (barreira permeável, transporte, atividade respiratória). A detecção da integridade de membrana é baseada na capacidade das células excluírem vários compostos químicos (corantes fluorescentes), quando usados a baixas concentrações, que não passariam através de membranas intactas. Células com membranas danificadas são consideradas mortas e podem ser detectadas antes de sua lise (Joux e Lebaron, 2000).

Parâmetros morfológicos, como ausência de conteúdo celular (Heissenberger, Leppard *et al.*, 1996) também podem ser utilizados para caracterizar morte ou inatividade de bactérias. Algo que sempre intrigou microbiologistas era a visualização à microscopia de fluorescência de formas bacterianas que não continham nucleóide, conhecidas como “*bacteria ghosts*”, que são consideradas inativas ou mortas (Zweifel e Hagstrom, 1995).

Mecanismos intrínsecos morte de bactérias em ambientes aquáticos ainda são pouco compreendidos, principalmente os relacionados a eventos de morte programados. A morte celular em bactérias e procariotos vem sendo amplamente discutida tendo como base o que já existe de conhecimento na literatura sobre outros organismos metazoários superiores.



## 1.4 MECANISMOS DE MORTE CELULAR

### 1.4.1 Considerações Gerais

A idéia de morte celular surgiu em meados dos anos 60 (Lockshin e Williams, 1964; 1965). Morte celular programada (MCP) é o termo utilizado para definir a morte geneticamente programada e foi proposto por (Lockshin e Williams, 1964), para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Kerr (1965) sugeriu o termo apoptose para indicar este tipo de morte celular. Porém a apoptose não é o único tipo de programa de morte. Schweichel e Merker (1973) propuseram uma classificação com 3 diferentes tipos de morte celular, incluindo “morte celular do tipo I” associada a heterofagia, “morte celular do tipo II” associada com autofagia e “morte celular do tipo III” associado a todo tipo de morte por “digestão”, correspondente a apoptose, morte celular autofágica e necrose.

Vários estudos referentes à morte celular se seguiram, e várias propostas referentes a nomenclatura e classificação dos tipos de morte celular foram propostos. O Comitê internacional de Nomenclatura em Morte Celular (NCCD), criado em 2005 pela revista “Cell Death and Differentiation” propõe que uma célula pode ser considerada morta, quando qualquer um dos seguintes fatores é encontrado: perda da integridade de membrana plasmática, a célula, incluindo seu núcleo, sofre fragmentação e compactação em “corpos distintos” (frequentemente referidos como “corpos apoptóticos”); e/ou estes corpos ou fragmentos são englobados por uma célula adjacente *in vivo* (Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009). É importante discriminar a célula morta como o ponto final de um processo de morte. Assim, células genuinamente “mortas” podem ser diferentes de células “morrendo” (Kroemer, El-Deiry *et al.*, 2005; Galluzzi, Maiuri *et al.*, 2007; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009).

A morte celular pode ser classificada de acordo com os critérios: morfológicos (aparência morfológica típica do processo de morte), enzimológicos (com envolvimento ou não de nucleases ou proteases), funcionais (programada ou não programada), de origem (fisiológica ou imunogênica) e características imunológicas (imunogênica ou não imunogênica).

Em 2005 e 2009, o NCCD propôs diversos morfotipos de morte celular e orientou o uso da terminologia utilizada (Kroemer, El-Deiry *et al.*, 2005; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009). Em 2012, este mesmo comitê ampliou a discussão sobre critérios de classificação de morte celular e propôs um sistema de classificação considerando avanços recentes, baseado também em características bioquímicas mensuráveis (Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012). Os principais mecanismos de morte celular serão descritos a seguir para organismos eucarióticos e procarióticos.

#### 1.4.2 Morte Celular em Organismos Multicelulares Eucarióticos

Em organismos multicelulares, a homeostasia é mantida pelo balanço entre proliferação e morte celular. Diversos mecanismos particulares de morte celular são descritos na literatura como: piroptose, partanatos, netose, entose e cornificação (Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009; Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012). Os principais, de modo geral são, a apoptose e a necrose.

##### 1.4.2.1 Apoptose

A apoptose é reconhecida como um processo de morte desencadeado por uma seqüência ordenada de inúmeras clivagens guiadas por enzimas hidrolíticas específicas, que degradam estruturas macromoleculares, como o DNA e o citoesqueleto, induzindo mudanças morfológicas características. É um mecanismo de morte altamente regulado, responsável por diversos processos biológicos em organismos multicelulares eucariotos. A apoptose atua, por exemplo, na reposição fisiológica de tecidos maduros, regulação do número de células e tamanho dos tecidos, no desenvolvimento embrionário, na atrofia de órgãos e estruturas, no desenvolvimento e funcionamento adequado do sistema imunológico e na eliminação de células infectadas, danificadas ou que estão submetidas a estresse no organismo (Fuchs e Steller, 2011).

A apoptose pode acontecer de forma dependente ou não de caspases, uma família de cisteínas proteases que são ubiquamente expressas como precursores inativos, chamados zigmogênios (Hengartner, 2000). As caspases são proteases específicas que possuem uma cisteína em seu sítio ativo e são capazes de

reconhecer e clivar substratos que possuem resíduos de aspartato. As caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, estando envolvidas na iniciação da cascata proteolítica e as caspases efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, e são responsáveis pela clivagem de substratos (Boatright e Salvesen, 2003; Pop e Salvesen, 2009). Após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem proteolítica e interagem com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (Boatright e Salvesen, 2003). As vias de ativação das caspases diferem em como são iniciadas, mas ambas irão convergir na ativação de zimogênios em pró-caspases. Uma vez ativado este processo, caspases ativadas clivam outras pró-caspases, em cascata. Mecanismos de ativação de caspases incluem clivagens proteolíticas a montante, indução por proximidade e associação com subunidade reguladora (Hengartner, 2000).

A ativação de caspases nas células são bem reguladas, já que a proteólise é irreversível. Para o controle da ativação de caspases são usados mecanismos de inibição, com uma cadeia de segmentos que imita o substrato; utilização de pseudo-caspases que competem pelos mesmos ativadores e degradação via proteossomos (Pop e Salvesen, 2009).

As caspases são associadas com processos de sinalização, não estando associadas com degradação inespecífica, ou seja, somente transmite sinais por clivagem específica de componentes celulares chaves. Sua ação enzimática é governada por um domínio específico para substratos protéicos contendo aspartato e usa a cisteína localizada em seu sítio ativo para catalisar a clivagem da ligação peptídica (Pop e Salvesen, 2009). As caspases clivam muitas proteínas e atuam, portanto, na clivagem dos principais constituintes celulares. Pelo fato das caspases clivarem muitas proteínas que atuam em diversas funções celulares, a morte através da ativação das caspases, provavelmente, resulta de muitas lesões potencialmente letais em vez de um único golpe fatal (Taylor, Cullen *et al.*, 2008).

A apoptose extrínseca é um tipo de morte caspase-dependente e é ativada pela via extrínseca ou de domínio de morte (Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012). Envolve receptores transmembrana da família fator de necrose tumoral (TNF). Os receptores da família TNF compartilham domínios extracelulares ricos em cisteína e possui um domínio citoplasmático de 80 aminoácidos, chamado de “domínio de morte”. Esse

domínio exerce papel fundamental na transmissão dos sinais de morte para a sinalização intracelular (Ashkenazi, 1998).

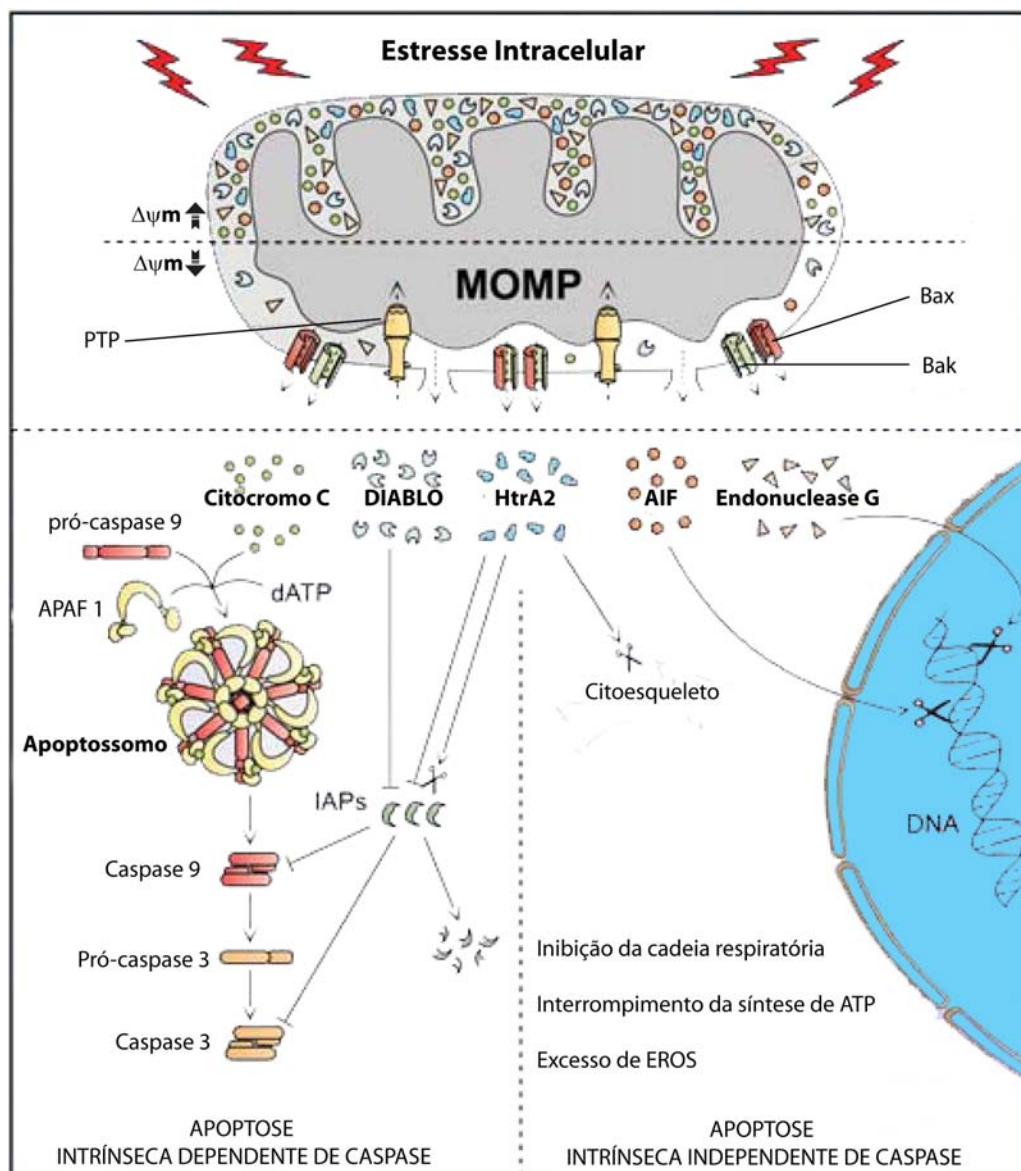
A ligação FasL/FasR e TNF- $\alpha$ /TNFR1 resulta no recrutamento das proteínas citoplasmáticas adaptadoras FADD (Proteína Fas associada com domínio de morte) e TRADD (receptor de fator de necrose tumoral 1- domínio de morte associado), respectivamente, formando um complexo indutor e sinalizador de morte (DISC), que recruta a pró-caspase 8 iniciadora e libera caspase 8 ativa no citosol. Esta ativa as caspases efetoras 3 e 7, resultando na clivagem de proteínas nucleares e no desencadeamento da apoptose (Martinez, Reif *et al.*, 2010).

A apoptose intrínseca é ativada pela via intrínseca ou mitocondrial, podendo ser dependente ou independente de caspases (Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012). Sua ativação ocorre por estresse intracelular ou extracelular, como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Desta forma, resulta de catástrofes metabólicas e bioenergéticas acopladas a múltiplos mecanismos executores ativados. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes estresses convergem principalmente para a mitocôndria (Fig.4). Esta organela integra os estímulos de morte celular, os quais induzem à permeabilização mitocondrial. Esta permeabilização se dá pela abertura de poros de transição da permeabilidade mitocondrial (PTP), que permite a entrada de solutos e água na organela. Em consequência, a mitocôndria torna-se permeável a várias moléculas, levando ao colapso do potencial de membrana, perda da função respiratória e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Assim ocorre a dilatação da matriz mitocondrial e ruptura da membrana externa, com a subsequente liberação das proteínas pró-apoptóticas mitocondriais (Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2007; Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012).

As proteínas pró-apoptóticas podem ativar a via intrínseca dependente ou independente de caspases (Fig. 3). A via dependente das caspases é ativada por proteínas pró-apoptóticas que englobam o citocromo C, Smac/DIABLO e outras serinoproteases (HtrA2). O citocromo C se liga a proteína adaptadora Apaf-1 e a pró-caspase 9, formando um apoptossomo, que leva à ativação da caspase 9, que por sua vez ativa as caspases efetoras 3 e 7. A atuação da smac/Diablo e HtrA2 inibem a atividade de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). Já a endonuclease G e o Fator indutor de apoptose (AIF) atua na fragmentação de DNA, provocando a

apoptose pela via independente das caspases. As proteínas da família Bcl-2 regulam a permeabilidade de membrana mitocondrial. Elas podem ter função pró-apoptótica, como a Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bic e B1k ou anti-apoptóticas, como a Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w e BAG (Wyllie, 2010). Como consequência da permeabilização da membrana mitocondrial ocorre a liberação de citocromo C e outras proteínas, que irão ativar a cascata de caspases ou atuar na morte de forma independente destas (Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2007).

Além do citocromo C, liberado pela mitocôndria, alguns estudos têm identificado o cálcio como co-mensageiro que coordena as interações entre retículo endoplasmático (RE) e mitocôndria durante a morte celular (Szabadkai e Rizzuto, 2004). O RE apresenta um ambiente oxidativo rico e elevado índices de  $Ca^{+2}$ . O cálcio e o citocromo C são considerados como mensageiros inter-organelares da apoptose. A apoptose induzida pelo estresse do retículo endoplasmático ocorre pela via intrínseca ou através da ativação da cascata de quinases pró-apoptóticas, que são ativadas por receptores da via extrínseca (Hussain e Ramaiah, 2007).



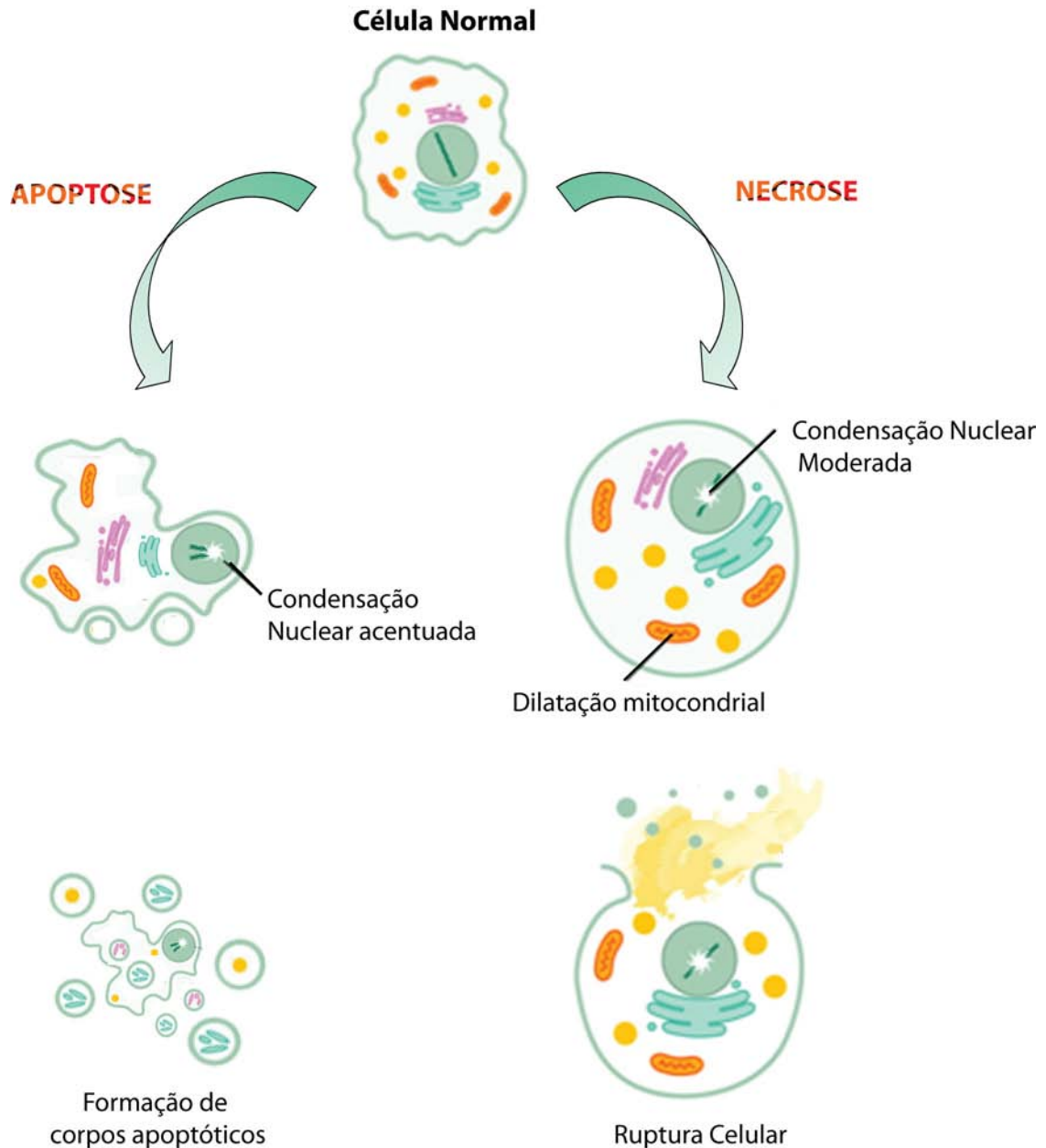
**Figura 3: Apoptose intrínseca dependente de caspases e apoptose intrínseca independente de caspases.** Em resposta a múltiplos estresses intracelulares, sinais de morte e sobrevivência são gerados e convergem para mitocôndria. Quando sinais letais prevalecem, ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial (MOMP) o que leva à dissipação do potencial de transmembrana mitocondrial, parando a síntese de ATP e o transporte ativo. Além disso, ocorre o desacoplamento da cadeia respiratória e geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). Como consequência, proteínas que geralmente estão confinadas no espaço intermembranoso mitocondrial são liberados no citosol. O citocromo C se dirige - em conjunto com uma proteína adaptadora citoplasmática e ATP - para o apoptossomo, um complexo multiprotéico que ativa uma cascata proteolítica Caspase-9 → Caspase 3. O segundo ativador de caspases mitocôndria-derivado, SMAC (também conhecido como Diabolo) e proteínas A2 (HTRA2) sequestram ou degradam vários membros da família de proteínas indutoras de apoptose (AIPs), facilitando a ativação de caspases. Na via independente de caspases, fatores indutores de apoptose (AIF) e endonucleases G, são realocados para o núcleo, mediando a fragmentação de DNA em larga escala. A HTRA2 também contribui, na apoptose caspase-independente clivando uma variedade de substratos (incluindo proteínas do citoesqueleto). Adaptado de Galluzzi, Vitale *et al.* (2012).

Várias mudanças podem ser observadas nas células em processo de apoptose. A caracterização de uma célula apoptótica é irrefutável quando a célula apresenta alterações morfológicas ultraestruturais típicas deste processo de morte. Estas alterações incluem (i) retração celular (ii) condensação da cromatina nuclear em massas bem delimitadas nas proximidades do envoltório nuclear, (iii) projeções da membrana plasmática que permanece intacta, mesmo em fases tardias de desintegração celular, (iv) pouca ou nenhuma alteração das organelas celulares, (iv) empacotamento de conteúdo celular em corpos apoptóticos (Fig. 4) (Kroemer, El-Deiry *et al.*, 2005; Elmore, 2007; Galluzzi, Maiuri *et al.*, 2007; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009; Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012).

Durante os estágios iniciais da apoptose, é observado o arredondamento e retração da célula. Isto se dá pela proteólise de constituintes do citoesqueleto. As caspases ativadas clivam componentes dos microfilamentos de actina, proteínas microtubulares e dos filamentos intermediários. Devido à retração celular, as células apresentam-se menores, com citoplasma mais denso e organelas mais agrupadas (Elmore, 2007). Ocorre também a formação de projeções de membrana plasmática (*blebs* na membrana) devido à clivagem do citoesqueleto, embora para a formação destas projeções deva haver pelo menos alguns filamentos de actina intactos (Taylor, Cullen *et al.*, 2008).

Um dos primeiros eventos a ser identificado na apoptose, é a fragmentação do DNA genômico, acompanhada pela condensação da cromatina. Este padrão é resultado da ação de endonucleases sobre os sítios específicos dos nucleossomos. Através da microscopia eletrônica de transmissão, pode se observar o núcleo bastante eletro-denso em células apoptóticas eucariotas. Dentre as alterações observadas no núcleo observa-se também a desintegração da lâmina nuclear e o colapso do envoltório nuclear (Ziegler e Groscurth, 2004; Taylor, Cullen *et al.*, 2008).

Durante a apoptose, a mitocôndria encontra-se fragmentada, devido à ação de fatores pró-apoptóticos de regulação da permeabilidade de membrana mitocondrial e liberação de proteínas localizadas no espaço intermembranoso. Essa organela pode também encontrar-se dilatada, com alterações morfológicas acentuadas (Szabadkai e Rizzuto, 2004).



**Figura 4 - Esquema mostrando principais alterações celulares ocorridas durante a apoptose e a necrose.** Durante a apoptose ocorre retração celular, com formações de projeções (*blebs*) de membrana, condensação acentuada da cromatina nuclear em massas bem delimitadas nas proximidades do envoltório nuclear, poucas alterações nas organelas celulares e na fase final do processo, empacotamento do conteúdo celular em corpos apoptóticos. Note que a membrana plasmática permanece intacta, mesmo em fases tardias da desintegração celular. Já na necrose, ocorre dilatação citoplasmática, dilatação e alterações mitocondriais e nas organelas celulares, condensação moderada da cromatina nuclear e ruptura da membrana plasmática, com conseqüente extravasamento do conteúdo celular.

Outros eventos característicos da apoptose são a fragmentação de organelas intracelulares, como o RE e o aparelho de Golgi. Através da ação de caspases ocorre o colapso do Golgi, com conseqüente inibição do tráfico de vesículas



secretoras. Pode-se observar em estágios mais tardios a vacuolização citoplasmática e o empacotamento das organelas em corpos apoptóticos, que são resultantes da formação das projeções de membrana (Wyllie, 2010).

O evento final da apoptose em organismos multicelulares eucarióticos, consiste no englobamento das células apoptóticas por células especializadas em fagocitose (fagócitos). Proteínas receptoras para estes fagócitos são expostas na face extracelular da membrana. A fosfatidilserina é uma proteína localizada na face intracelular da membrana plasmática. Após estímulo de morte, ocorre a translocação desta para a face extracelular. A inversão da fosfatidilserina induz a fagocitose (Taylor, Cullen *et al.*, 2008), porém não pode ser considerada uma prerrogativa de apoptose, pois pode ocorrer em outros tipos menos comuns de morte (Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012). O fato de, mesmo depois do colapso celular a membrana se manter íntegra, permite que a célula seja fagocitada, sem liberação de componentes prejudiciais ao meio circundante.

A apoptose é mais bem estudada e melhor compreendida forma de MCP em organismos multicelulares eucariotos animais. Atualmente, a apoptose vem sendo amplamente reconhecida em outros modelos de seres vivos. Em plantas, a “apoptosis-like” é documentada como um processo de morte distinto de outras formas de morte encontradas nestes seres, sendo caracterizada, dentre outros fatores, pela morfologia do corpo celular e intensa condensação de seu protoplasto (Reape e McCabe, 2010). A ocorrência de morte celular programada com características apoptóticas clássicas também têm sido descritas em fungos e protozoários (Deponte, 2008).

#### 1.4.2.2 Necrose

A necrose foi inicialmente descrita como um tipo de morte não programada, que ocorre de forma acidental. Porém, estudos têm demonstrado que o processo que leva a este tipo de morte pode ser regulado por uma série de vias de sinalização e mecanismos catabólicos (Golstein e Kroemer, 2007). Receptores de domínio de morte têm sido associados com vias de transdução, em particular na presença de inibidores de caspase. Esta proteína possui relação com o CD65, que é um receptor que induz apoptose (Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009).

O termo oncose foi anteriormente descrito para designar células morrendo caracterizadas por dilatação celular, sendo o termo necrose aplicado a características das células depois de mortas (Majno e Joris, 1995). Atualmente, é proposto que estes termos sejam sinônimos, referindo-se a “morte celular necrótica” ou por necrose (Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009).

A morte celular por necrose apresenta características morfológicas bastante diversificadas, mas, geralmente, não possui os intrincados mecanismos regulatórios da apoptose (Ziegler e Groscurth, 2004). As principais características de morte celular por necrose incluem (Fig. 4): dilatação celular, aumento de volume celular, condensação moderada da cromatina, dilatação das organelas celulares e ruptura mecânica da membrana plasmática com conseqüente perda dos componentes internos (Kroemer, El-Deiry *et al.*, 2005; Galluzzi, Maiuri *et al.*, 2007; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009). Pode ocorrer ainda dissociação dos ribossomos do retículo endoplasmático, e a desintegração nuclear. A ruptura celular ocorre pela membrana plasmática tornar-se permeável durante o processo (Ziegler e Groscurth, 2004). Podem ser verificadas ainda alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, que leva a liberação EROS e alterações lisossomais que incluem maior permeabilização da membrana lisossomal, com liberação de óxido nítrico (Nicotera, Bernassola *et al.*, 1999). Durante o processo de necrose, pode haver produção de lipases, esfingomielases e lipoxigenases, com conseqüente degradação de lipídeos, aumento de  $Ca^{++}$  citosólico e produção de proteases diferentes das caspases (Nicotera e Melino, 2004).

Os principais eventos celulares morfológicos que caracterizam a apoptose e necrose encontram-se resumidos na tabela 1.

Tabela 1- Principais eventos morfológicos que caracterizam os processos de apoptose e necrose, segundo Comitê de nomenclatura em morte celular. (Kroemer, El-Deiry *et al.*, 2005; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009; Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012)

| PRINCIPAIS EVENTOS         | APOPTOSE  | NECROSE  |
|----------------------------|---|--|
| Alterações citoplasmáticas | Redução do volume celular com retração de pseudópodes<br>Projeções ( <i>blebs</i> ) de membrana | Dilatação citoplasmática                           |
| Alterações Nucleares       | Condensação acentuada da cromatina<br>Fragmentação do núcleo                                    | Condensação moderada da cromatina                  |
| Organelas                  | Pouca ou nenhuma alteração ultraestrutural das organelas  | Dilatação das organelas                            |
| Alterações de membrana     | Membrana plasmática íntegra até estágios tardios do processo                                    | Ruptura mecânica da membrana plasmática            |
| Envolvimento de proteases  | Dependente ou independente de caspases  | Produção de proteases não-caspases                 |
| Final do processo          | Formação de corpos apoptóticos<br>englobamento por fagócitos <i>in vivo</i>                     | Liberação do conteúdo celular no meio extracelular |

### 1.4.3 Morte Celular em Organismos Unicelulares Eucarióticos e Procarióticos

Conforme exposto acima, o fenômeno de morte celular programada, principalmente a apoptose, é bem conhecido em organismos eucarióticos multicelulares, constituindo evento essencial para a manutenção e desenvolvimento destes organismos. No entanto, os mecanismos de morte celular ainda são muito pouco estudados em organismos procarióticos. A maioria dos trabalhos em procariotos têm como objeto de estudo as bactérias patogênicas e abordam a MCP resultante da ação de fatores de estresse e antibióticos (Lewis, 2000; Engelberg-Kulka, Amitai *et al.*, 2006), discutidos abaixo.

#### 1.4.3.1 Papel da MCP em organismos unicelulares e bactérias

Pesquisas têm revelado que a MCP também pode ocorrer em vários organismos unicelulares eucarióticos, incluindo algumas espécies de fungos e outros protistas, como algas unicelulares e protozoários (Deponte, 2008). Os fenótipos de morte celular destes organismos unicelulares apresentam muitas características semelhantes com a apoptose que ocorre em organismos multicelulares, quando submetidos a fatores ou sinais extracelulares de estresse. Estas semelhanças incluem fragmentação de DNA, projeções (*blebbings*) citoplasmáticas e vacuolizações (Ameisen, 2002). Por exemplo, trabalho recente de nosso Grupo identificou ocorrência de apoptose em *Leishmania amazonensis* induzida por compostos tripanossomicidas. Neste protozoário foram observadas fragmentação de DNA e inversão da fosfatidilserina, além de alterações morfológicas e ultraestruturais típicas de apoptose (Ribeiro, 2011).

O fato de a apoptose ser documentada em muitos organismos unicelulares eucariotos indica que o papel altruístico da MCP na sobrevivência celular não está limitado a organismos multicelulares. Embora estes não sejam multicelulares *per se*, eles vivem em comunidades nas quais o auto sacrifício de uma célula irreversivelmente danosa ou uma população de células, pode beneficiar os parentes clonais circundantes, poupando recursos e garantindo a sobrevivência do genoma da população como um todo (Rice e Bayles, 2003). O conceito de MCP, desenvolvido para explicar fenômenos de células de metazoários, tem sido ponte

para estudo da MCP em organismos unicelulares, levando a um benefício nutricional para coespecíficos, ou alguma outra vantagem (Lewis, 2000).

Atualmente, tem sido sugerido que MCP ocorra em organismos procariotos e teria papel semelhante ao que ocorre em organismos eucariotos, como eliminar células durante processos de desenvolvimento ou células com algum dano (Rice e Bayles, 2003). Em bactérias, os então chamados processos “autolíticos” podem representar MCP, pois as autolisinas – compostos que mediam a “autólise” – são produzidos pelas próprias células (Shockman, Daneo-Moore *et al.*, 1996; Lewis, 2000). Um dos primeiros exemplos de MCP em organismos procariotos unicelulares foi reconhecido durante a esporulação da bactéria saprófita não patogênica *Bacillus subtilis* (Smith e Foster, 1995). O processo de esporulação neste microorganismo é acionado pela escassez de nutrientes no ambiente, o que resulta em uma divisão celular assimétrica, produzindo uma célula mãe e um esporo. Antes da liberação dos esporos, a célula mãe é ativamente lisada (Smith e Foster, 1995; Nugroho, Yamamoto *et al.*, 1999), fornecendo nutrientes para maturação dos esporos e facilitando, assim, sua germinação.

À primeira vista, pode parecer que a MCP não seria benéfica para organismos unicelulares bacterianos. Contudo, estes exibem um comportamento social relativamente sofisticado. Eles vivem em comunidades complexas, como biofilmes ou corpos de frutificação, e coordenam expressões gênicas e comportamentos de grupo por “quorum-sense” (QS). (Engelberg-Kulka, Amitai *et al.*, 2006).

Em muitas comunidades, interrelações entre bactérias individuais são similares às que ocorrem entre as células eucarióticas em vários tecidos. Embora a idéia de comunidades bacterianas ‘comportando-se’ como organismos multicelulares ainda tenha pouca aceitação entre os microbiologistas, sabe-se que comunicações intercelulares e atividades coordenadas são consideradas comuns entre as bactérias (Gray, 1997; Decho, Norman *et al.*, 2010).

O QS ou controle de expressão de genes em resposta à densidade bacteriana, é utilizado para regular várias funções fisiológicas. Em todos os casos de QS há a participação de moléculas sinalizadoras chamada de autoindutores (Miller e Bassler, 2001). Os sinais de QS podem ser modificados por alterações nos ambientes naturais e estes podem ser percebidos por receptores celulares. Desta forma, informações ambientais importantes podem ser adquiridas (Decho, Norman *et*

*al.*, 2010). O QS pode refletir uma das formas de como as bactérias se auto regulam, através de sinais de comunicação célula-célula. A densidade celular é detectada e transmitida por um sistema de QS (Bassler, 1999; Miller e Bassler, 2001), que por sua vez, pode regular várias funções celulares, inclusive induzir componentes celulares geneticamente controlados que levam à morte (Hayes, 2011).

#### 1.4.3.2 Sistema toxina/antitoxina e morte celular programada em bactérias

Em bactérias, os mecanismos mais descritos de morte celular programada são os relacionados aos sistemas genéticos de módulos “toxina-antitoxina” (TA). Estes sistemas são constituídos de dois genes, presentes em módulos do cromossomo bacteriano. No sistema TA, um gene codifica a formação de uma proteína estável tóxica que impede o crescimento celular e pode levar à morte. O outro gene é responsável pela síntese de um “antídoto” que neutraliza a síntese do produto tóxico. A antitoxina pode ser uma proteína ou uma espécie de RNA antisense intradutível (Ming Xi-U, et al, 2010; Prozorov et al, 2009). Estudos com *Escherichia coli*, identificam morte celular programada ligada ao sistema toxina-antitoxina mazEF, onde estão envolvidos os genes: mazF e mazE, os quais codificam uma toxina estável e uma anti-toxina lábil, respectivamente. A toxina mazF é uma endoribonuclease que cliva RNA mensageiros em uma única fita (Belitsky, Avshalom *et al.*, 2011). Estes genes aparecem relacionados à morte de bactérias no caso de privação de nutrientes, antibióticos, aumento da temperatura, dano no DNA e estresse oxidativo. O sistema mazEF, mediador de morte celular, requer um fator extracelular, constituído de um peptídeo sinal de comunicação célula-célula (Engelberg-Kulka, Amitai *et al.*, 2006; Kolodkin-Gal, Hazan *et al.*, 2007). Neste caso, a população pode agir como um organismo multicelular em que uma subpopulação de células morre e libera nutrientes (Aizenman, Engelberg-Kulka *et al.*, 1996), moléculas de sinalização ou livra-se da infecção por fagos (Engelberg-Kulka, Amitai *et al.*, 2006). A ação destes sistemas é qualificada na maioria dos trabalhos de revisão como um tipo de apoptose, ou seja, uma morte celular programada geneticamente (Rice e Bayles, 2003; Engelberg-Kulka, Amitai *et al.*, 2006; Rice e Bayles, 2008; Prozorov e Danilenko, 2010). Desta forma, permite o “suicídio” de

algumas bactérias, frente a fatores de estresse, permitindo a sobrevivência da população (Prozorov e Danilenko, 2010).

O primeiro sistema TA estudado foi o ccd (control cell death) localizado no plasmídeo F de *E. coli* (Jaffe, Ogura *et al.*, 1985). Neste, e em outros microrganismos, foram encontrados sistemas TA cromossomais similares, relacionados à morte celular. Em *E. Coli*, já foram descritos mais de 33 sistemas TA, enquanto em *Micobacterium tuberculosis* e em *Micobacterium smegmatis* foram descritos 60 e 2, respectivamente. Dentre eles, alguns foram relacionados com apoptose (Yamaguchi, Park *et al.*, 2011).

#### 1.4.3.3 Semelhanças de MPC em eucariotos e bactérias

Existem vários pontos de ligação, tanto morfológicos como moleculares, entre a MCP em eucariotos e bactérias, assim como procariotos de forma geral. Um aspecto da MCP que ocorre em eucariotos e procariotos é a fragmentação de DNA, resultado de quebras massivas em suas fitas duplas (Fernandez, Cartelle *et al.*, 2008). A fragmentação de DNA tem sido extensivamente utilizada como um marcador de morte por apoptose, tanto em organismos eucariotos (Taylor, Cullen *et al.*, 2008) quanto em procariotos (Fernandez, Cartelle *et al.*, 2008).

A atividade de proteínas com função proteolítica semelhantes à caspases está associada a “morte celular rápida” (MCR), que ocorre durante a fase exponencial de culturas de *Xantomonas campestris*, uma bactéria patogênica da soja. Neste caso, é possível identificar DNA fragmentado no sobrenadante das culturas, ligação da anexina -V na membrana das bactérias, e a produção de uma enzima com atividade semelhante à caspase-3 em células eucarióticas. Esta enzima foi detectada por Western blotting através de um anticorpo caspase-3 humana, não sendo observado MCR nos mutantes que não possuíam esta enzima. Este fato sugere que a morte observada nas cepas de *Xanthomonas* encontra-se relacionada com MCP (Gautam e Sharma, 2002). Raju, Misra *et al.* (2007) demonstraram atividade de poli-ADP-ribose-polimerase (PARP) associada com a produção de caspases em *X. Campestris*, outro indicativo da ocorrência de apoptose neste microorganismo.

Atividades de caspases também foram detectadas em cianobactérias marinhas, as quais apresentam rápido crescimento seguido por uma abrupta lise celular relacionada com fatores ambientais (Bidle e Falkowski, 2004; Franklin, Brussaard *et al.*, 2006). Em *Trichodesmium* sp., proteínas associadas com o início da morte reagiram com anticorpos policlonais para caspase-3 humana e com um substrato específico desta caspase. Foram também encontradas alterações morfológicas incluindo a degradação de componentes celulares (tilacóides, carboxissomos, vesículas de gás e grânulos), degradação do DNA e retração celular com membrana plasmática íntegra (Berman-Frank, 2004). Assim, foi especulado que este processo facilita a transferência de matéria orgânica e inorgânica para comunidades microbianas heterotróficas. Em geral, estes achados apoiam a hipótese de que nos microrganismos procariotos estariam as origens evolutivas que deram origem a MCP caspase-dependente em plantas superiores e animais (Bidle e Falkowski, 2004).

Positividade para ensaio TUNEL, indicando fragmentação de DNA, foi detectada em cultura de cianobactérias do gênero *Anabaena*, submetidas a estresse salino. Neste estudo, também foram encontrados aumento da atividade de proteases e desintegração de conteúdos celulares (Ning, Guo *et al.*, 2002). Positividade para o TUNEL também foi documentada em culturas de *E. coli* submetidas a tratamentos com hidrogênio-peroxidase (Rohwer e Azam, 2000).

Algumas proteínas com função semelhante às encontradas na regulação da permeabilidade de membrana mitocondrial durante eventos apoptóticos em eucariotos, são encontradas em bactérias. As proteínas de membrana “holin/antiholin” estão principalmente associadas à lise celular bacteriana na infecção por vírus bacteriófagos. Os bacteriófagos, durante o ciclo lítico, controlam o tempo de lise da bactéria para sua liberação no meio circundante, e propagação da infecção. As proteínas “holin” são programadamente codificadas por genes e atuam na permeabilização da membrana plasmática bacteriana, e sua conseqüente lise. Fato este, que permite a atividade de endolisinas que são hidrolases mureínas classificadas como autolisinas, que irão degradar o peptidoglicano da parede e liberar os fagos (Rice e Bayles, 2003; Pang, Moussa *et al.*, 2011). A lise prematura mediada pela proteína “holin” é prevenida pela presença de uma segunda proteína, denominada “antiholin”, que se difere por possuir dois aminoácidos na extremidade



N e tem a função de inibir a lise celular (Young, 2002). As proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família bcl-2 regulam e controlam eventos via mitocondrial na apoptose clássica (Danial e Korsmeyer, 2004). De forma similar à Bax mitocondrial, as proteínas “holin” causam permeabilidade de membrana por um processo de oligomerização protéica. As proteínas “antiholin” irão agir como a Bcl-2, que, na mitocôndria, interage com Bax para inibir a morte celular, embora o mecanismo pelo qual isso ocorra ainda seja controverso (Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2007; Rice e Bayles, 2008). Proteínas reguladas pelos sistemas de regulação gênica, operons Cid/Lrg, possuem função semelhante às proteínas “holin” e “antiholin” (Bayles, 2003; Rice e Bayles, 2008). Além disso, outra similaridade deste sistema com a apoptose é seu papel no metabolismo de carboidratos. O metabolismo da glicose parece desempenhar papel central na expressão de Cid/Lrg e na morte celular. Interessantemente, o papel do metabolismo da glicose no controle da apoptose também já foi demonstrado (Rice e Bayles, 2008). As semelhanças notáveis entre o controle de apoptose mediados por Bax/Bcl-2 e o controle de morte e lise bacteriana mediados por holin / antiholin, levam à hipótese de que os eventos que levam a autólise de bactérias são análogos, bioquimicamente e fisicamente, aos eventos que levam à ruptura das mitocôndrias durante os estágios iniciais da apoptose (Bayles, 2007; Pang, Moussa *et al.*, 2011).

Alterações morfológicas ultraestruturais similares às ocorridas durante a apoptose em células eucarióticas, podem ser observados em bactérias, em resposta a condições ambientais desfavoráveis. A bactéria patogênica *Helicobacter pylori* em cultura, modifica sua morfologia normal helicoidal, para a forma cocóide quando submetida a fatores estressantes como, aerobiose, privação de nutrientes, alta temperatura e exposição a antibióticos (Kusters, Gerrits *et al.*, 1997; Cellini, Robuffo *et al.*, 2001). Apesar da alteração da forma poder ser atribuída à adaptações a condições adversas do meio (Azevedo, Almeida *et al.*, 2007), foram verificados padrões apoptóticos clássicos de células eucarióticas, como a perda de potencial de membrana e da integridade do DNA, além da presença de corpos elétron-densos apresentando DNA condensado (Kusters, Gerrits *et al.*, 1997; Cellini, Robuffo *et al.*, 2001).

A fragmentação de DNA genômico e aparecimento de projeções (*blebs*) de membrana plasmática também foram observados durante a morte hifal de

estreptomicetos. Estes são bactérias gram-positivas do solo, que durante seu ciclo de vida formam muitas hifas com vários nucleóides. Durante a esporulação e formação do corpo de frutificação, grande parte destas hifas morre, e as que sobrevivem irão formar cadeias de esporos maduros na colônia. Durante este processo de morte, ocorre desorganização progressiva do nucleóide, que envolve a fragmentação do DNA genômico; degradação de componentes citoplasmáticos; retração da membrana plasmática e parede celular e sua dissociação em uma série de vesículas (Miguélez, Hardisson *et al.*, 1999).

#### 1.4.3.4 Significado e complexidade de MCP em Bactérias

Vários eventos de morte em bactérias encontram-se relacionados com MCP, principalmente casos que envolvam altruísmo por parte de algumas células. Lewis (2000) infere que mecanismos de MCP tem inúmeras funções em bactérias, como facilitar mudanças genéticas, ajudar no desenvolvimento, eliminar células defeituosas da população, bem como diminuir a carga de mutantes que poderiam potencialmente destruir e levar a morte de toda população. A visão tradicional de morte celular bacteriana e lise como um processo passivo e simples está sendo rapidamente substituída por uma visão de um mecanismo complexo e altamente regulado, e considerado um componente importante da fisiologia bacteriana. Novos estudos se fazem importantes na compreensão de mecanismos, sinais reguladores, vias que sinalizam entre vida e morte de bacterias e ligação evolutiva entre as origens de MCP em bactérias e eucariotos (Bayles, 2003; Rice e Bayles, 2008).

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Com relação a bactérias aquáticas de vida livre, ainda não existem estudos que tratem de MCP nestes organismos. As implicações de MCP em bactérias aquáticas abririam avanço significativo no entendimento de sua ecofisiologia, desde sua relação com o meio até relações individuais célula-célula nestes ambientes.

Tendo em vista o exposto sobre a importância da morte de bactérias, e sua relação com fatores ambientais diversos em ecossistemas aquáticos, bem como a escassa literatura a cerca de MCP em bactérias aquáticas, o presente trabalho foi realizado visando contribuir para o entendimento de MCP do bacterioplâncton.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de MCP em bactérias aquáticas de vida livre utilizando dois modelos de ecossistemas aquáticos: lago Batata e lago dos Manacás.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a viabilidade celular de bactérias aquáticas através do uso de marcador específico para integridade de membrana;
- Investigar a morte celular de bactérias aquáticas por citometria de fluxo através de ensaio de fragmentação de DNA;
- Caracterizar a diversidade morfológica da comunidade bacteriana por microscopia eletrônica de transmissão;
- Investigar, por microscopia eletrônica de transmissão, a ocorrência de alterações celulares em bactérias aquáticas;
- Contribuir para o entendimento da MCP bacteriana em ecossistemas aquáticos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E ÁREAS DE COLETA

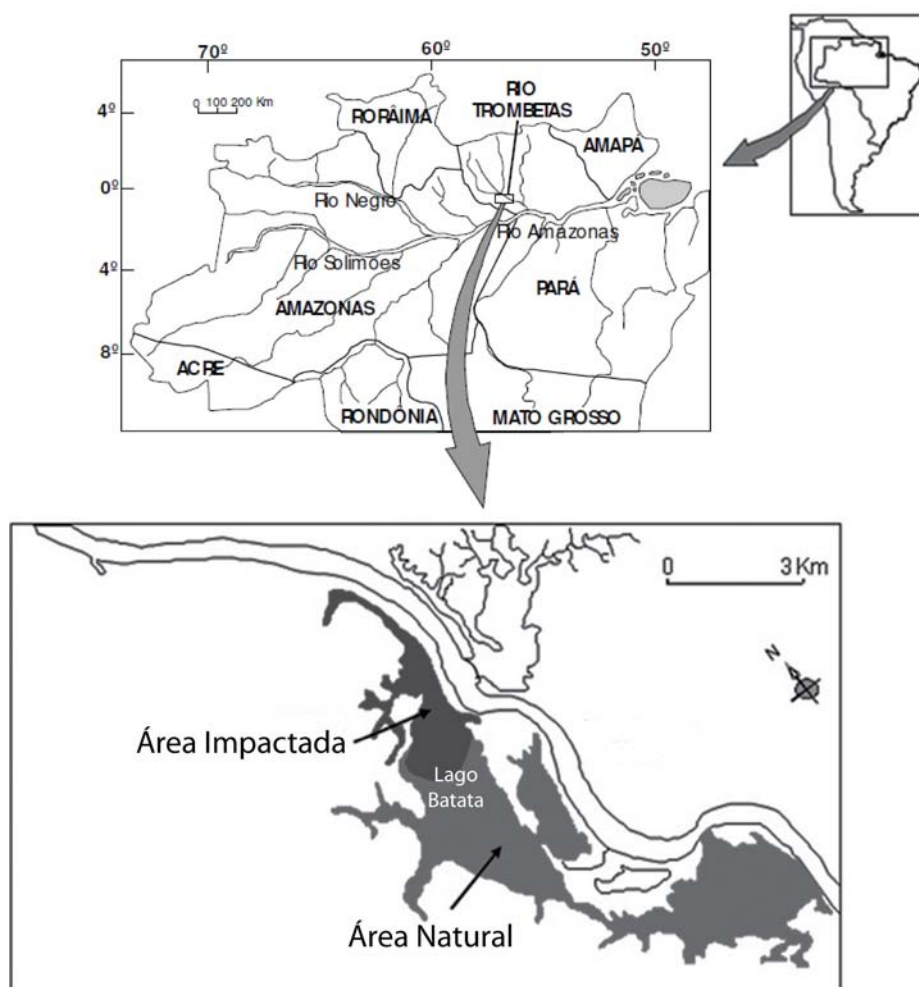
As amostras foram coletadas em dois modelos de ecossistemas aquáticos: lago Batata e lago dos Manacás.

O lago Batata (10 30'N e 56020'W) é um lago de inundação da Bacia Amazônica, localizado à margem do rio Trombetas, próximo a Porto Trombetas, no município de Oriximiná, no estado do Pará, Brasil (Fig. 5). O lago Batata é classificado, de acordo com a tipologia proposta por Harold Sioli (Sioli, 1984), como um ecossistema de águas claras, que são caracterizadas por apresentarem pouca quantidade de nutrientes e pouca matéria em suspensão. Neste lago, o desenvolvimento das populações e processos ecológicos é controlado pelo pulso de inundação (Junk, 1989), peculiar aos sistemas rio-planície de inundação tropical. Desta forma, o lago sofre acentuada variação sazonal do nível de água. Nos períodos de águas altas, a conexão entre os sistemas aquáticos e terrestres aumenta, e nos períodos de águas baixas, esta conexão fica reduzida.

Entre os anos de 1979 e 1989, o lago sofreu impacto pelo lançamento de rejeito oriundo do beneficiamento do minério de bauxita na região. A bauxita é processada com jatos de água produzindo um efluente líquido (rejeito), composto de 7% a 9% de partículas sólidas de grãos finos (96% são menores do que 50 $\mu$ m), representada principalmente por óxidos de alumínio, silicatos e óxidos de ferro (Lapa, 2000). Este fator tornou o impacto sofrido um caso único, já que impactos ecológicos em áreas tropicais alagáveis, resultantes do despejo deste tipo de rejeito de bauxita, eram até então desconhecidos. Originalmente, o rejeito ocupava cerca de 30% da área do lago. Devido às constantes ressuspensões, provocadas pela flutuação do nível do lago, o rejeito se espalhou para uma área maior do que a inicial (Roland e Esteves, 1993).

Atualmente distinguem-se duas áreas no corpo principal do lago : área natural, praticamente livre do rejeito de bauxita e área impactada, apresentando sedimento original coberto por uma camada compacta do efluente do processamento de bauxita (Fig.5). Na área impactada, o rejeito comumente

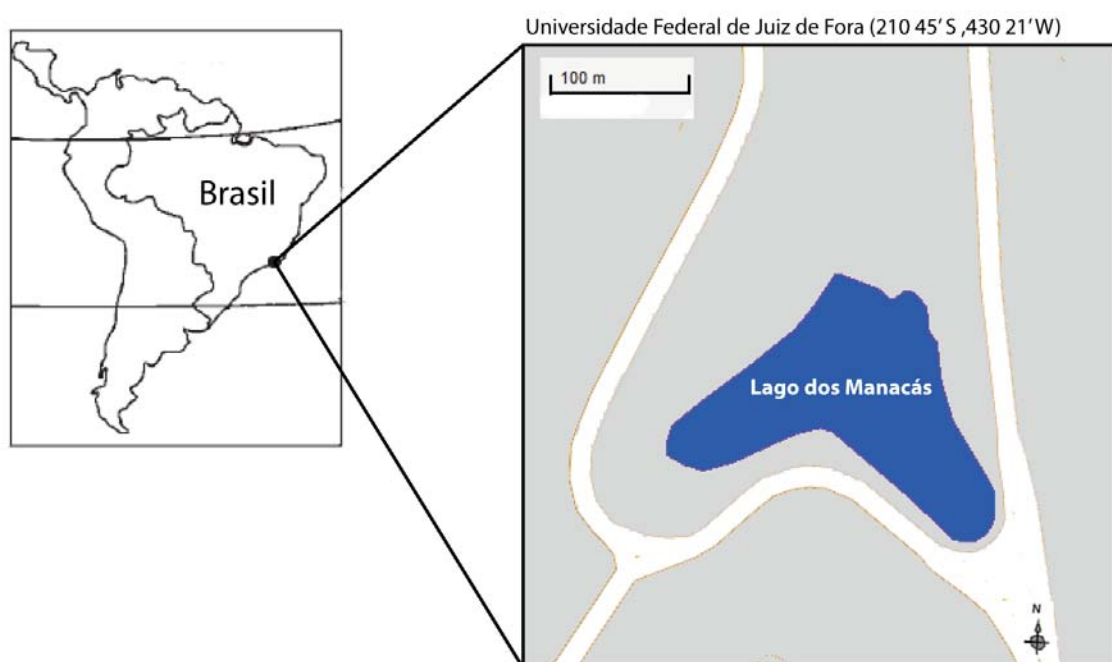
sedimenta-se com as bactérias aderidas, o que juntamente com a maior predação nesta área, gera uma densidade bacteriana menor do que na área natural.



**Figura 5 – Localização Geográfica do Lago Batata.** O Lago Batata é um ecossistema aquático amazônico que faz parte da bacia de inundação do Rio Trombetas. Localiza-se próximo ao distrito de Porto Trombetas, município de Oriximiná, estado do Pará, Brasil. Pode-se distinguir duas áreas diferentes dentro do lago: i) Impactada por rejeito de bauxita (cinza escuro); ii) Natural, sem influência do rejeito (cinza claro).

O lago dos Manacás é um ecossistema aquático artificial localizado no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora ( $21^{\circ} 45' S$  e  $43^{\circ} 21' W$ ), no estado de Minas Gerais (Fig. 6). É um reservatório pequeno ( $0,02\text{km}^2$ ) e raso (5,0 m de profundidade máxima) cercado por um remanescente de Floresta Atlântica. O clima regional é tropical de altitude (Cwa, sistema de classificação de Köppen) com uma estação fria seca e uma estação quente e chuvosa. É alimentado por nascentes localizadas na área e recebe água drenada enriquecida com resíduos sólidos provenientes do Campus Universitário ao seu entorno (Lawall, Torres *et al.*, 2005).

As amostras foram coletadas na sub-superfície dos lagos, fixadas em campo ou transportadas resfriadas e preparadas para diferentes análises conforme a seguir. Três grupos foram estudados: lago Batata – área natural, lago Batata – área impactada e lago dos Manacás. No lago Batata, as amostras foram obtidas durante diferentes períodos, entre 2005 e 2011 enquanto no Lago dos Manacás as amostras foram obtidas entre os períodos de Junho/2010 a dezembro/2011. Estas coletas fazem parte do processo de monitoramento destes lagos pelo Grupo de Ecologia Aquática da UFJF.



**Figura 6 – Localização Geográfica do Lago dos Manacás.** O lago dos Manacás é um ecossistema aquático artificial, localizado na região sudeste do Brasil, no Estado de Minas Gerais dentro do campus da Universidade Federal de Juiz de Fora.

### 3.2 VIABILIDADE CELULAR

Para análise da viabilidade celular, baseado na integridade de membrana, foi utilizado o kit LIVE/DEAD *BacLight* (Molecular Probes). Este kit é constituído de dois marcadores: SYTO 9 que cora todas as células, íntegras ou com danos na membrana e iodeto de propídeo, o qual penetra somente em bactérias com danos em sua membrana, causando uma redução na fluorescência do SYTO 9. Com a mistura destes marcadores, bactérias com membranas intactas emitem

fluorescência verde e bactérias que apresentam dano de membrana, emitem fluorescência vermelha.

Volumes iguais dos marcadores SYTO 9 e iodeto de propídeo foram misturados. A cada 3 $\mu$ L desta solução, adicionou-se 1 mL da amostra. As amostras foram incubadas por 20 minutos no escuro e, em seguida, citocentrifugadas (Shandon cytopsin 4, Thermo Electron) a 452x g por 10 min em alta aceleração. As lâminas resultantes foram analisadas em microscópio de fluorescência BX-60 (Olympus), equipado com filtro U-MWB com a emissão no comprimento da luz azul, o qual possibilita a visualização simultânea dos marcadores. A contagem foi realizada em 10 campos aleatórios. Para cada grupo, foram analisadas 5 amostras.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA

A avaliação da fragmentação de DNA foi detectada pelo ensaio TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling), utilizando o kit comercial APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit (Molecular Probes) e citometria de fluxo.

O kit detecta células apoptóticas, tendo em vista o fato da fragmentação de DNA, característica de apoptose, expor um grande número de hidroxilas 3' (Bortner, Oldenburg *et al.*, 1995). Estes grupos hidroxilas servem como pontos iniciais para deoxinucleotidil transferase terminal (TdT). A adição do análogo desoxitimidina 5-bromo-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (BrdUTP) para a reação TdT serve para rotular os locais de quebra. Uma vez incorporado ao DNA, a BrdU é detectada por um anticorpo anti-BrdU marcado com o marcador fluorescente Alexa 488, produzindo conjugados fluorescentes brilhantes e fotoestáveis.

#### 3.3.1 Quantificação do Número de Bactérias por Volume de Amostra

Para processamento do ensaio TUNEL por citometria de fluxo, realizou-se a quantificação do número total de bactérias com a finalidade de se ajustar o volume de cada amostra contendo 1x10<sup>6</sup> bactérias.

As amostras foram filtradas (poro 0,8  $\mu$ m) para retirada de partículas maiores e preparadas em citocentrífuga, (Shandon cytopsin 4, Thermo Electron), utilizando-



se volume de 1mL por amostra e lâminas de vidro de rotina. As amostras foram fixadas em formaldeído 2%, coradas com 4'6 diamidina-2-fenilindole, 4-dihidrocloro (DAPI) concentração final 5µg/mL e citocentrifugadas a 452 x g, durante 10 minutos em alta aceleração. As lâminas foram montadas com óleo de imersão e as bactérias contadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-60) em 10 campos aleatórios, em aumento de 1000x. Para a quantificação bacteriana foi utilizado o seguinte fator de conversão:  $(nxA)/(Vxa)$ , onde n= número de células contadas, a= área da grade contada, e V= (volume fixado de amostra x volume contado)/ (volume da amostra) + (volume do fixador).

Para análise por citometria de fluxo, foram fixados volumes de amostra filtrados, contendo  $1 \times 10^6$  bactérias de acordo com a tabela 2.

Tabela 2- Volumes de amostras filtradas processadas para citometria de fluxo.

| Amostras | Lago dos Manacás (10 <sup>5</sup> Cél/mL) | Lago Batata - área natural (10 <sup>5</sup> Cél/mL) | Lago Batata - área impactada (10 <sup>5</sup> Cél/mL) |
|----------|---|---|---|
| 1        | 14,81                                     | 1,96  | 4,88  |
| 2        | 19,71                                     | 3,04  | 5,55  |
| 3        | 23,64                                     | 5,68  | 11,27   |
| 4        | 4,71                                      | 4,08  | 6,88  |
| 5        | 16,83                                     | 3,23  | 6,88  |
| 6        | 9,00                                      | 8,00  | 6,88  |
| 7        | 6,00                                      | -   | -   |
| 8        | 8,00                                      | -   | -   |
| 9        | 10,00                                     | -   | -   |
| 10       | 10,00                                     | -   | -   |

### 3.3.2 Análise por Citometria de Fluxo

Uma vez ajustado o volume das amostras contendo  $1 \times 10^6$  bactérias/ amostra, estas foram fixadas em paraformaldeído filtrado, na concentração final de 2% (Roland, Lobão *et al.*, 2010). Posteriormente as células foram permeabilizadas com etanol 70% a - 4°C por 30 minutos, lavadas em tampão fosfato-salino (PBS) e preparadas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do kit (Molecular Probes). Os controles negativos foram realizados seguindo o mesmo procedimento,

porém sem a incorporação da enzima TdT. As amostras foram analisadas em citômetro FACSCalibur equipado com programa de computador Cell Quest no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz (Fundação Oswaldo Cruz, RJ). Um total de 1000 eventos foi obtido e os dados foram analisados utilizando-se o programa Summit v4.3 (Beckman Coulter Inc).

### 3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a análise ultraestrutural de bactérias por MET, foram processadas amostras coletadas na estação impactada do lago Batata. As amostras foram filtradas em membrana de 30 $\mu$ m para serem removidas as partículas e organismos maiores, e imediatamente fixadas, ainda em suspensão, em solução de Karnovsky (1% paraformaldeído e 1% de glutaraldeído) durante 1 h, conforme protocolo de rotina do Laboratório de Biologia Celular da UFJF (Barros, Farjalla *et al.*, 2010). Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, e centrifugadas (254 x g a 15°C por 20 minutos) para obtenção de pellets. Em seguida, estes foram incluídos em ágar 2%, o que possibilita que as etapas subsequentes sejam realizadas sem o contato direto com os organismos. Esta pré-inclusão em ágar reduz os artefatos causados por danos mecânicos e a perda de espécimes durante os procedimentos que se seguem (Melo, Rosa *et al.*, 2007).

Os blocos de ágar contendo as amostras foram pós fixados em ósmio reduzido (ferrocianeto de potássio 3% em tampão fosfato 0.2M e ósmio 2% em água destilada) por 1h em temperatura ambiente e lavados por 3 vezes em tampão fosfato 0,1M, pH7,3. Após a lavagem com tampão maleato de sódio, pH 5,2, as amostras foram contrastadas *in bloc* com acetato de uranila 2% em tampão maleato de sódio (0,05 M, pH 6,0) por 2 horas à temperatura ambiente e lavadas com a mesma solução tampão. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etapas de concentrações crescentes de álcoois (50%, 70%, 90%, 95%), passando em cada etapa duas vezes por 5 minutos e, posteriormente em acetona (5 minutos). Após a desidratação, as amostras foram pré-infiltradas em meio de inclusão epon/acetona (2:1) overnight à temperatura ambiente, infiltradas em meio com DPM-30 e incluídas em resina (Polybed 812, Polysciences, Warrington, PA, USA). Após polimerização por 16 horas à 60°C, foram feitos cortes ultrafinos em ultramicrotomo (Sorval MT2,

newton, MA, USA), os quais foram contrastados com citrato de chumbo. As amostras foram analisadas em diferentes aumentos em microscópio eletrônico de transmissão (CM 10; Philips, Eindhoven, The Netherlands e Tecnai Spirit G12, FEI, The Netherlands) em 60 KV.

### 3.5 OBTENÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS

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

Para as análises ultraestruturais, foram estudadas 35 micrografias em aumentos de 15000x a 150000x. Para as avaliações morfométricas das bactérias nas micrografias obtidas por MET foi utilizado o programa Image J (National Institute of Mental Health, USA). Os seguintes parâmetros foram estudados:

- 1- **Integridade ultraestrutural bacteriana.** Esta foi analisada e classificada de acordo com Heissenberger, Leppard *et al.* (1996) em (A) **intactas**, quando apresentaram membrana plasmática, parede celular e estruturas internas sem dano estrutural, (B) **danificadas**, para células que apresentaram dano em alguma estrutura e/ou em membrana e parede celular, e (C) **vazias**, células que apresentaram conteúdo esvaziado e/ou com fragmentos de estruturas amorfas que não apresentam similaridade com as estruturas citoplasmáticas.
- 2- **Tamanho médio da cápsula bacteriana;**
- 3- **Número de fagos por secção celular.**

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

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

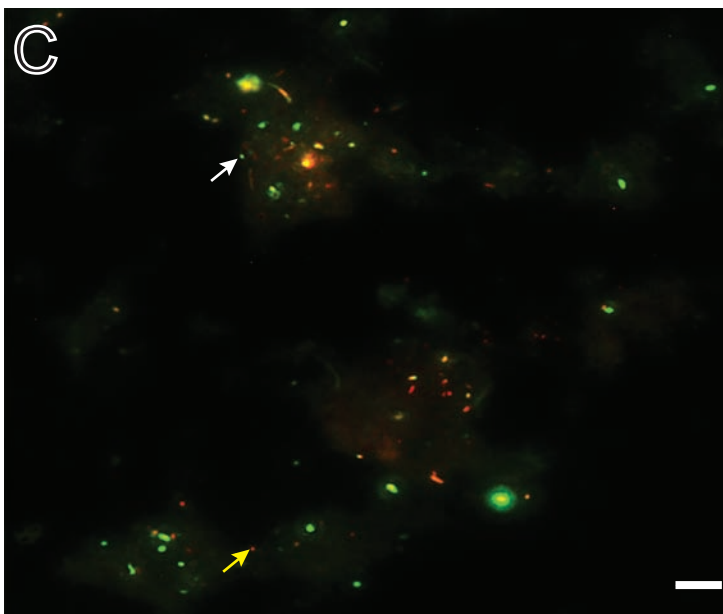
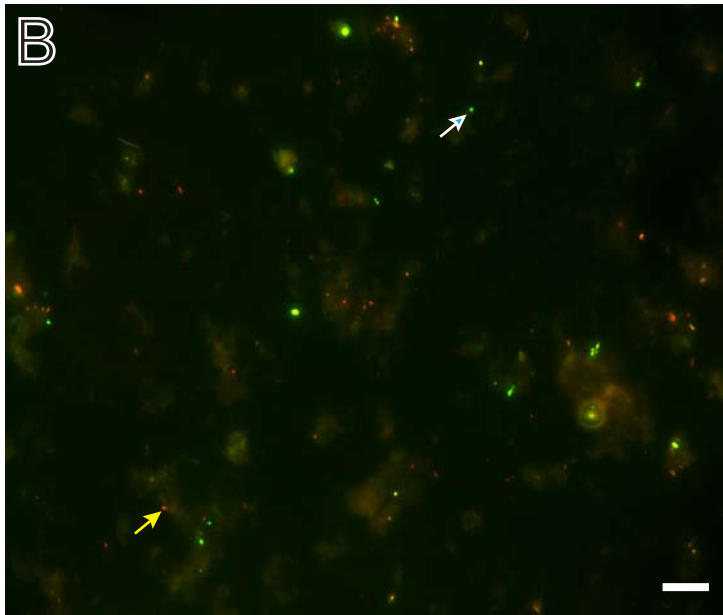
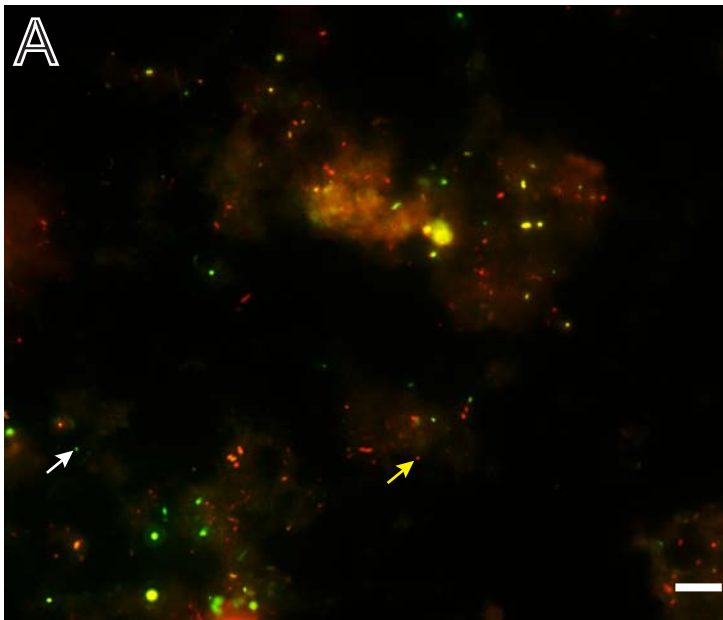
## 4. RESULTADOS

### 4.1 VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da integridade da membrana celular foi usada como indicativo da viabilidade de bactérias aquáticas. A técnica de citocentrifugação, aliada à utilização do kit LIVE/DEAD *BacLight*, permitiu boa visualização, por microscopia de fluorescência, de bactérias viáveis e inviáveis nas amostras dos ecossistemas estudados. De acordo com os marcadores utilizados (SYTO 9 e iodeto de propídeo), células com membranas alteradas apresentaram fluorescência vermelha, enquanto células com membranas intactas apresentaram fluorescência verde (Fig. 7 A-C).

Análises quantitativas de bactérias viáveis e não viáveis foram feitas nos grupos experimentais. Considerando todas as amostras coletadas nos três ecossistemas estudados (lago Batata- área natural; lago Batata- área impactada e lago dos Manacás), o total de bactérias viáveis foi significativamente maior do que o total de bactérias inviáveis ( $F=20,71$ ,  $p=0,0001$ ) (Fig.8 A).

O lago Batata, considerando as áreas impactada e não impactada em conjunto, apresentou mais bactérias não viáveis (36,20%) em comparação com o Lago dos Manacás (19,66%) (Fig.8 B), sendo que a área impactada do lago Batata apresentou a maior porcentagem média de células inviáveis (39,66%). Porém, não houve diferença significativa entre as médias de bactérias viáveis e não viáveis encontradas nas duas áreas do lago Batata ( $p > 0,001$ ). A figura 8 C apresenta a porcentagem média de bactérias viáveis e não viáveis nos ecossistemas estudados e suas diferenças significativas.



**Figura 7 - Bactérias aquáticas de vida livre observadas por microscopia de fluorescência após coloração com Baclight (SYTO 9 e Iodeto de propídeo).** As amostras foram coletadas em 3 ecossistemas: (A) lago Batata - área impactada, (B) lago Batata - área natural, (C) lago dos Manacás, fixadas e preparadas por citocentrifugação. As bactérias aparecem como células de tamanho diminuto. Em verde bactérias viáveis (setas brancas) e em vermelho bactérias não viáveis (setas amarelas). Barra = 5  $\mu\text{m}$  (A - C).

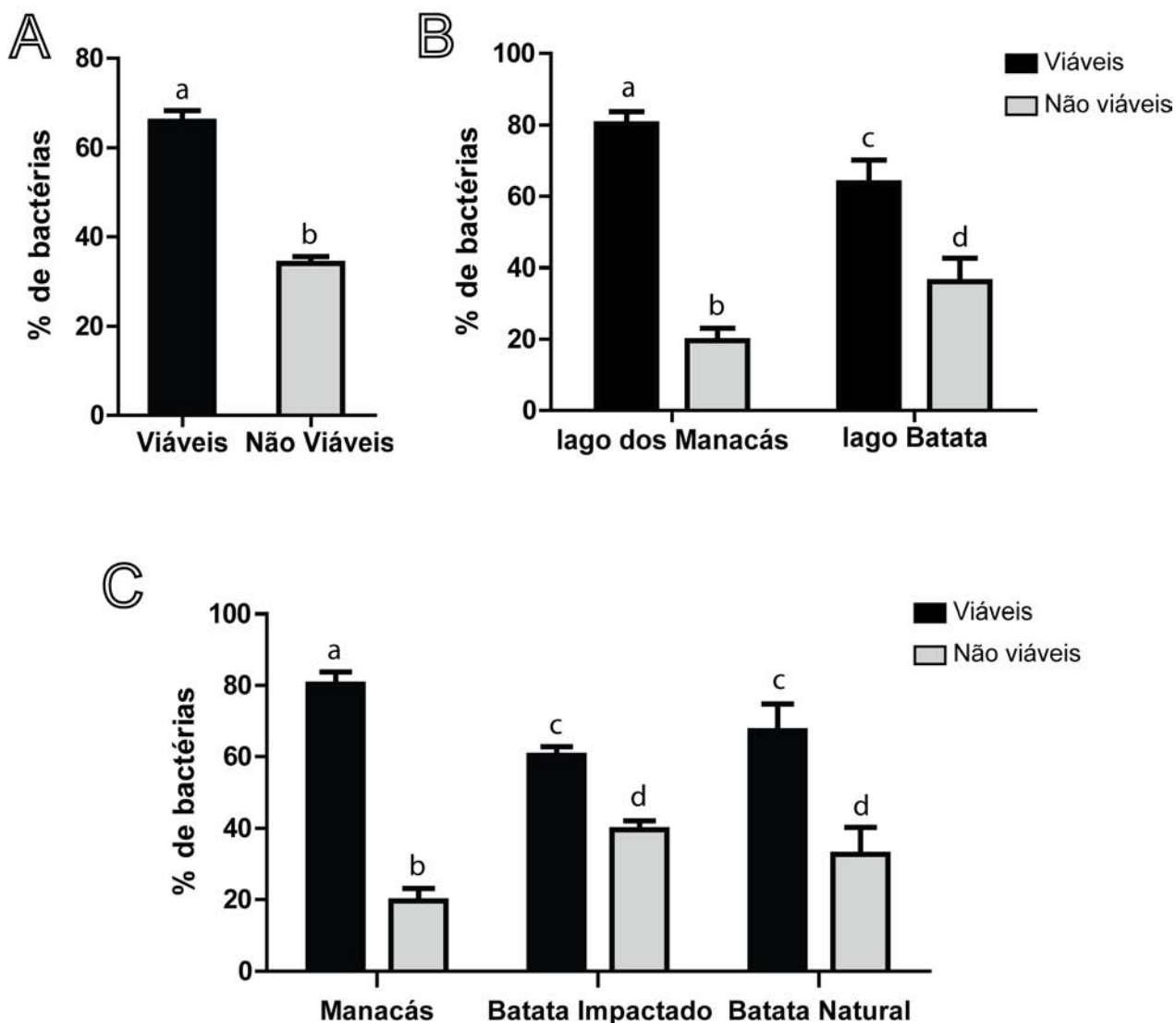


Figura 8 - **Porcentagens médias de bactérias de vida livre viáveis e não viáveis do lago dos Manacás, lago Batata – área impactada e lago Batata – área natural.** Amostras em cada grupo (n=5) foram citocentrifugadas, coradas com o kit LIVE/DEAD *BacLight* e analisadas em microscopia de fluorescência. Em cada lâmina, foram contados 10 campos e as porcentagens de bactérias viáveis e não viáveis estabelecidas. Em (A), as porcentagens são apresentadas nos 3 grupos em conjunto. Em (B), os dados são mostrados por ecossistema, enquanto em (C), são visualizados em cada grupo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.2 ANÁLISES DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO

A fragmentação de DNA é resultado de quebras massivas das duplas fitas de DNA, sendo considerada um marcador de morte celular (Fernandez, Cartelle *et al.*, 2008). Para avaliar a ocorrência de fragmentação de DNA em bactérias aquáticas nos ecossistemas estudados, foi utilizado o ensaio TUNEL, conforme descrito anteriormente.

Para ajustar o volume de amostra para processamento do ensaio TUNEL, foram feitas contagens de bactérias em lâminas preparadas por citocentrifugação, coradas com DAPI (Fig. 9), e quantificadas por microscopia de fluorescência, conforme descrito em material e métodos. A tabela 3 mostra os resultados obtidos.

Tabela 3 - Densidade Bacteriana

| Amostras | Lago dos Manacás (10 <sup>5</sup> Cél/mL) | Lago Batata - área natural (10 <sup>5</sup> Cél/mL) | Lago Batata - área impactada (10 <sup>5</sup> Cél/mL) |
|----------|---|---|---|
| 1        | 0,675                                     | 5,096   | 2,048   |
| 2        | 0,558                                     | 3,283   | 1,800   |
| 3        | 0,423                                     | 1,760   | 0,887   |
| 4        | 2,120                                     | 2,448   | 1,454   |
| 5        | 0,594                                     | 3,092   | 1,454   |
| 6        | 1,111                                     | 1,250   | 1,429   |
| 7        | 1,667                                     | -   | -   |
| 8        | 1,250                                     | -   | -   |
| 9        | 1,000                                     | -   | -   |
| 10       | 1,000                                     | -   | -   |

A análise pelo ensaio TUNEL revelou a ocorrência de fragmentação de DNA nas bactérias aquáticas em todos os grupos estudados. As porcentagens de fragmentação de DNA foram significativamente diferentes entre si comparando os 3 grupos ( $F=3,61$ ,  $p=0,0479$ ). Além disso, a porcentagem de fragmentação de DNA nos controles negativos, que não receberam o tratamento com a enzima TdT, foram significativamente diferentes das amostras que foram tratadas com o TdT ( $p<0,05$ ).

Na figura 10 podemos observar resultados representativos obtidos por citometria de fluxo e as porcentagens médias de DNA fragmentado no lago dos Manacás e nas estações, impactada e natural, do lago Batata.

A estação impactada do lago Batata apresentou a maior média de fragmentação de DNA, 10,61% significativamente diferente ( $p<0,05$ ), em comparação com sua área natural e com o lago dos Manacás. No entanto, não houve diferença significativa quando as médias da área natural do lago Batata e a do lago dos Manacás foram comparadas.

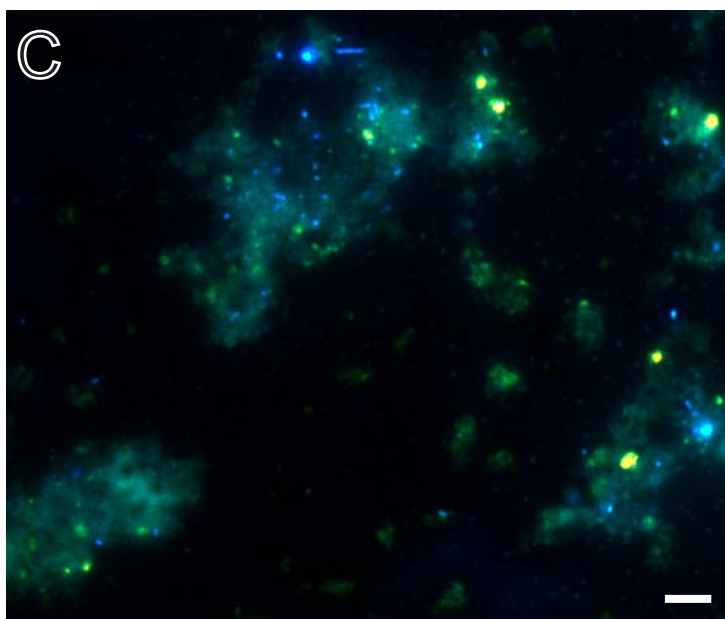
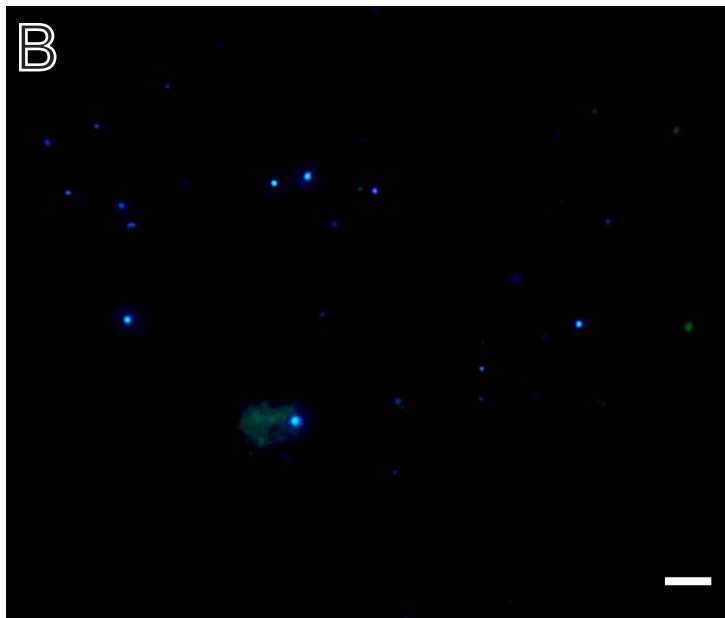
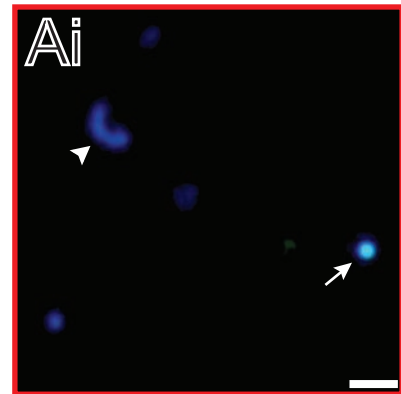
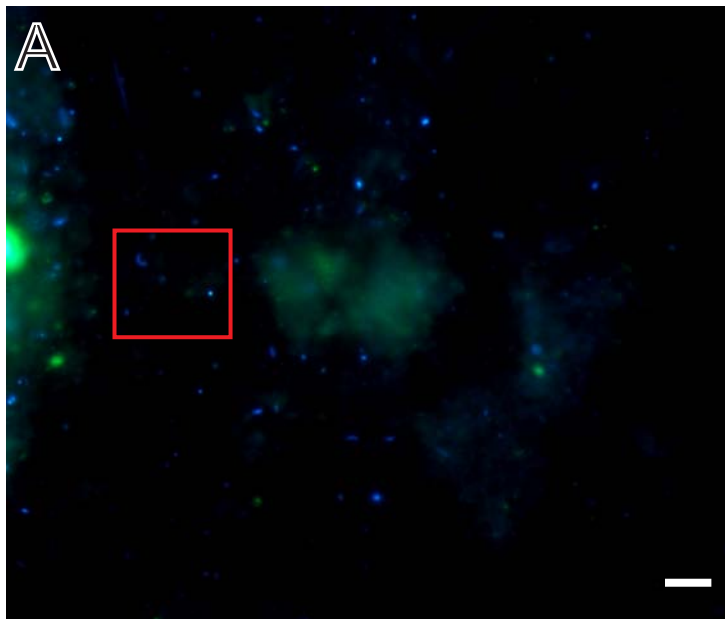


Figura 9 - Bactérias aquáticas de vida livre observadas por microscopia de fluorescência após coloração com DAPI. As amostras foram coletadas em 3 ecossistemas: (A) lago Batata - área natural, (B) lago Batata - área impactada e (C) lago dos Manacás, fixadas e preparadas por citocentrifugação. As bactérias aparecem como células de tamanho diminuto e contorno regular, coradas em azul pelo DAPI. Em (Ai) são indicadas 2 bactérias com formatos diferentes: cocóide (seta) e vibrióide (cabeça de seta). Barra = 5  $\mu$ m (A - C) e 1  $\mu$ m (Ai).



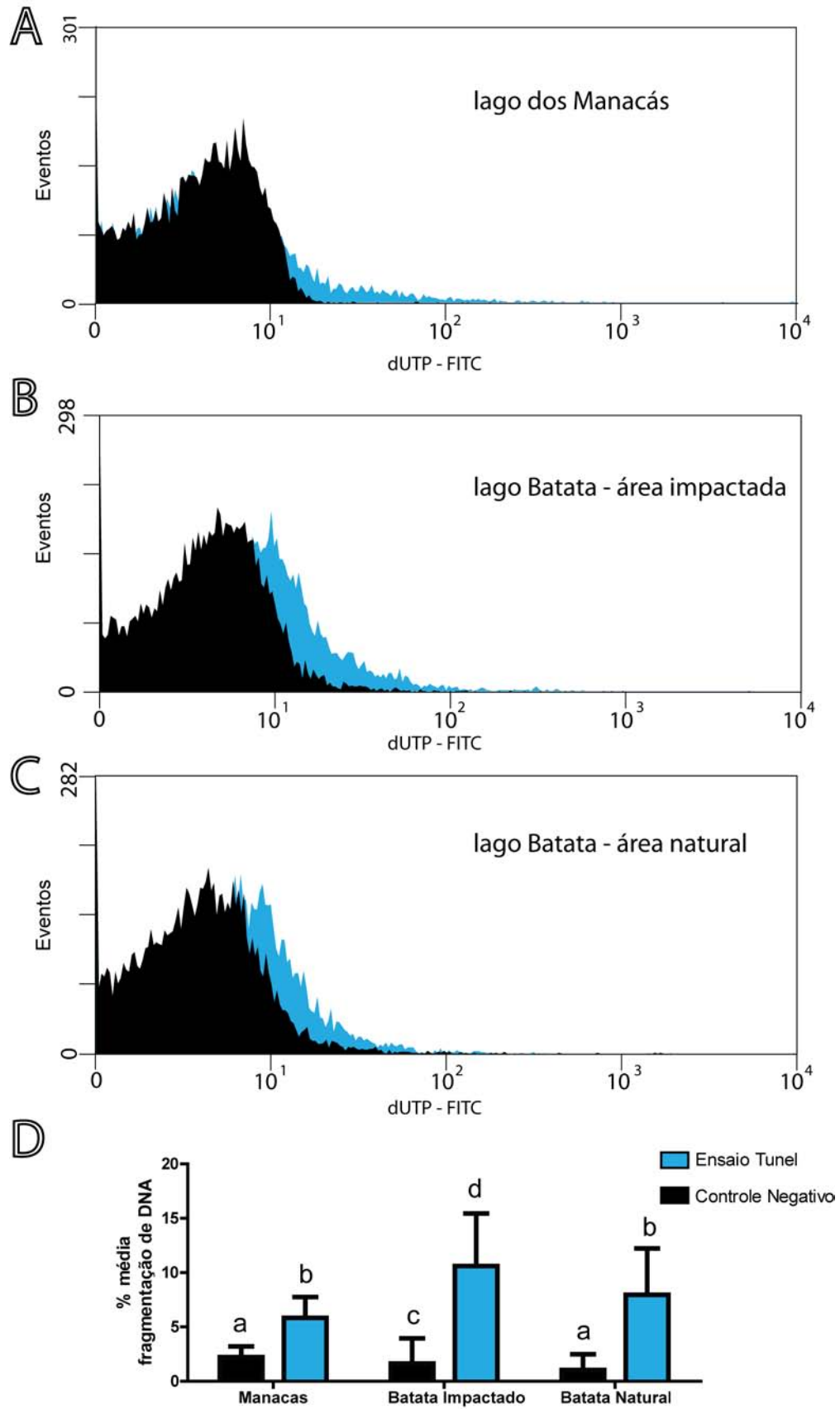


Figura 10 – Fragmentação de DNA em bactérias aquáticas avaliada pelo ensaio TUNEL através de citometria de fluxo. Os histogramas (A - C) são representativos do (A) lago dos

Manacás (n = 10), (B) lago Batata- área impactada (n= 6) e (C) lago Batata – área natural (n = 6) e seus respectivos controles negativos. Em (D), a porcentagem média de fragmentação de DNA foi comparada entre os grupos. Ocorreu diferença significativa entre todos os grupos analisados e seus controles negativos e entre o lago Batata – área impactada e os demais grupos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 ULTRAESTRUTURA

Tendo em vista que o maior número de bactérias aquáticas inviáveis (Fig. 8) foi encontrado no lago Batata, e a maior incidência de fragmentação de DNA bacteriano detectada na área impactada (Fig. 10), amostras do lago Batata –área impactada foram processadas para análise ultraestrutural por MET.

#### 4.3.1 Características Gerais

As formas bacterianas analisadas por MET apresentaram, de maneira geral, estruturas típicas como nucleóide (N) (Fig. 11, Fig. 12 A e Fig. 12 B), membrana plasmática (Fig. 11 Ai, Fig. 11 Bi e Fig. 12 Aii), parede celular (Fig. 11 Ai, Fig. 11 Bi e 12 Aii), e presença de grânulos citoplasmáticos elétron-densos (Gr) (Fig. 11 B e 12 A).

As bactérias apresentaram grande diversidade ultraestrutural, representada por diferenças morfológicas quanto às seguintes estruturas:

- 1- **Envoltório celular:** foram encontradas bactérias com envoltórios mostrando diferentes espessuras e composição (compare as Fig. 11 Ai, Fig. 11 Bi e Fig.12). Foi possível observar envoltórios tipicamente gram-positivos, que apresentaram membrana plasmática e parede celular com ou sem periplasma (Fig. 11 Ai e Fig. 11Bi) e também envoltórios tipicamente gram-negativos, composto por membrana plasmática, e parede celular com periplasma e membrana externa (Fig. 12 Aii).
- 2- **Mesosomos:** presença ou não desse sistema de endomembranas. Ressalta-se que estes mesossomos encontravam-se associados ao nucleóide (Fig.11A e Fig. 11Aii);
- 3- **Cápsula:** presença (Fig. 12) ou não (Fig. 11) de cápsulas com diferentes espessuras. Análises morfométricas mostraram grande variação quanto à espessura da cápsula. Esta variou entre 10,7nm a 117,0nm. Além disso,

estas estruturas capsulares apareceram em 31,43% das bactérias analisadas por MET.

- 4- **Partículas aderidas:** presença ou não de partículas do substrato formando um conjunto com a camada capsular (Fig. 12) ou partículas em associação direta com bactérias (Fig. 14 B). As bactérias mostraram-se total (Fig. 12) ou parcialmente (Fig. 14 B) envoltas pelas partículas. Cerca de 51,43 % das bactérias apresentaram partículas aderidas.
- 5- **Vesículas membranosas:** foram observadas bactérias liberando vesículas membranosas provenientes da membrana externa em direção à cápsula adjacente (Fig. 12 Aii) e no meio extracelular (Fig. 13 Bi).
- 6- **Tilacóides:** foi observada uma proporção pequena de bactérias contendo morfologia típica de sistema de tilacóides (Fig. 13).

Além disso, as bactérias mostraram diferenças no tamanho, com diâmetro variando entre 0,12 $\mu$ m e 2,0 $\mu$ m, e na elétron-densidade citoplasmática. Enquanto uma população mostrou áreas citoplasmáticas muito elétron-densas (Fig. 11A), outras bactérias apresentaram citoplasma uniformemente elétron lúcido (Fig. 11B). Um aspecto interessante observado foi a íntima associação entre bactérias (Fig. 14A) e também a presença de vírus no citoplasma bacteriano (Fig. 14). Os resultados sobre vírus e infecção viral bacteriana serão apresentados no item 4.3.1.2 – Partículas virais x integridade ultraestrutural.

A tabela 3 sumariza todas as estruturas bacterianas observadas por MET nas amostras analisadas e suas respectivas descrições morfológicas e funções potenciais.

Tabela 3 - Descrições morfológicas das estruturas bacterianas observadas por MET.

| Estrutura                  | Descrição Morfológica   | Figura                       |
|----------------------------|---|------------------------------|
| <b>Membrana Plasmática</b> | Membrana de aspecto trilaminar que delimita a o citoplasma bacteriano.  | 11 Ai e Bi<br>12 Aii         |
| <b>Periplasma</b>          | Região entre membrana plasmática e parede celular (gram-positivas). Ou entre membrana plasmática e membrana externa (gram-negativas).   | 11 Ai<br>12 Aii              |
| <b>Parede celular</b>      | Estrutura adjacente à membrana plasmática. Camada espessa elétron-denso composta por peptídeoglicanos (bactérias gram-positivas). Ou o conjunto formado por periplasma e membrana externa (gram-negativas). | 11 Ai e Bi<br>12 Aii         |
| <b>Membrana externa</b>    | Membrana com estrutura trilaminar adjacente ao periplasma e membrana plasmática, nas bactérias gram-negativas.  | 11 Ai<br>12 Aii              |
| <b>Cápsula</b>             | Camada extracelular elétron-lúcida adjacente a parede celular. Formada basicamente por uma matrix de exopolímeros, com alto teor de polissacarídeos.  | 12 A<br>12 Ai                |
| <b>Envoltório celular</b>  | Conjunto de estruturas que envolvem a célula bacteriana. É formada por membrana plasmática, parede celular e cápsula, quando presente.  | 11 Ai e Bi<br>12 A, Ai e Aii |

|                     |   |                                     |
|---------------------|---|-------------------------------------|
| <b>Vesículas</b>    | Vesículas membranosas de secreção, com formato esférico, formadas a partir da membrana externa. Podem conter proteínas, LPS, fosfolipídeos, autolisinas, além de outros constituintes presentes na parede celular, espaço periplasmático, membrana plasmática e/ou no citoplasma. | 12 Aii<br>13 Bi                     |
| <b>Mesossomos</b>   | Invaginações da membrana plasmática em forma de sacos tubulares, vesiculares ou lamelares. Estão envolvidos na divisão celular, formação de esporos e transporte de enzimas.  | 11 A e Aii<br>(cabeça de seta)      |
| <b>Tilacóides</b>   | Sistema de endomembranas lamelares que ocupam grande área do citoplasma da célula e servem para aumentar a superfície de reações enzimáticas para processos metabólicos.  | 13 A e B<br>(T)                     |
| <b>Grânulos</b>     | Estruturas esféricas elétron-densas, geralmente com função de estocagem de compostos orgânicos e inorgânicos.   | 11 B<br>12 A e Ai<br>(Gr)           |
| <b>Nucleóide</b>    | Região elétron-lúcida presente no citoplasma onde se localiza o DNA celular.  | 11 A e B<br>12 A<br>13 A<br>(N)     |
| <b>Fagos Virais</b> | Pequenas partículas elétron-densas, com formato arredondado e tamanho da ordem de 30-110nm, presentes no citoplasma bacteriano. Possuem estrutura simples, formada por um capsídeo protéico envolvendo material genético.   | 11 A e B<br>12 A<br>13 A<br>(setas) |

---

### 4.3.2 Integridade Ultraestrutural

As bactérias obtidas por MET foram analisadas de acordo com sua integridade ultraestrutural e classificadas segundo Heissenberger, Leppard *et al.* (1996) em intactas, danificadas ou vazias (tabela 4) apresentando as seguintes características ultraestruturais:

1 – **Bactérias intactas**: membrana plasmática, parede celular e estruturas internas não alteradas (Fig. 11, Fig. 12 e Fig. 13)

2 – **Bactérias danificadas**: com perda parcial da integridade ultraestrutural exibindo dano em estruturas internas, membrana plasmática e/ou parede celular (Fig. 14 A2 e Fig. 14B).

3 - **Bactérias vazias**: perda total da integridade ultraestrutural com esvaziamento do conteúdo intracelular (Fig. 14 A1 e Fig. 14 A3). Algumas células vazias continham regiões amorfas no citoplasma, fortemente elétron-densas sem similaridade com estruturas citoplasmáticas típicas (Fig. 15 A). Estas regiões provavelmente representam áreas de condensação citoplasmática.

Tabela 4 - Frequência de bactérias Intactas, danificadas e vazias. n=35.

| Integridade Celular | %     |
|---------------------|-------|
| Intactas            | 42,86 |
| Danificadas         | 31,43 |
| Vazias              | 25,71 |

#### 4.3.2.1 Integridade ultraestrutural e sua relação com cápsula e partículas do meio

As cápsulas são formadas por exopolímeros celulares que se acumulam na superfície da célula bacteriana próximo ao envoltório celular. Os resultados das análises morfométricas mostraram que a média da espessura das cápsulas não é significativamente diferente quando as 3 categorias de bactérias (intactas, danificadas e vazias) foram comparadas ( $F=1,835$ ;  $p=0,1760$ ). Porém, a frequência de ocorrência de cápsula é menor nas bactérias vazias (22,2%), do que nas danificadas (27,27%) e intactas (33,33%).

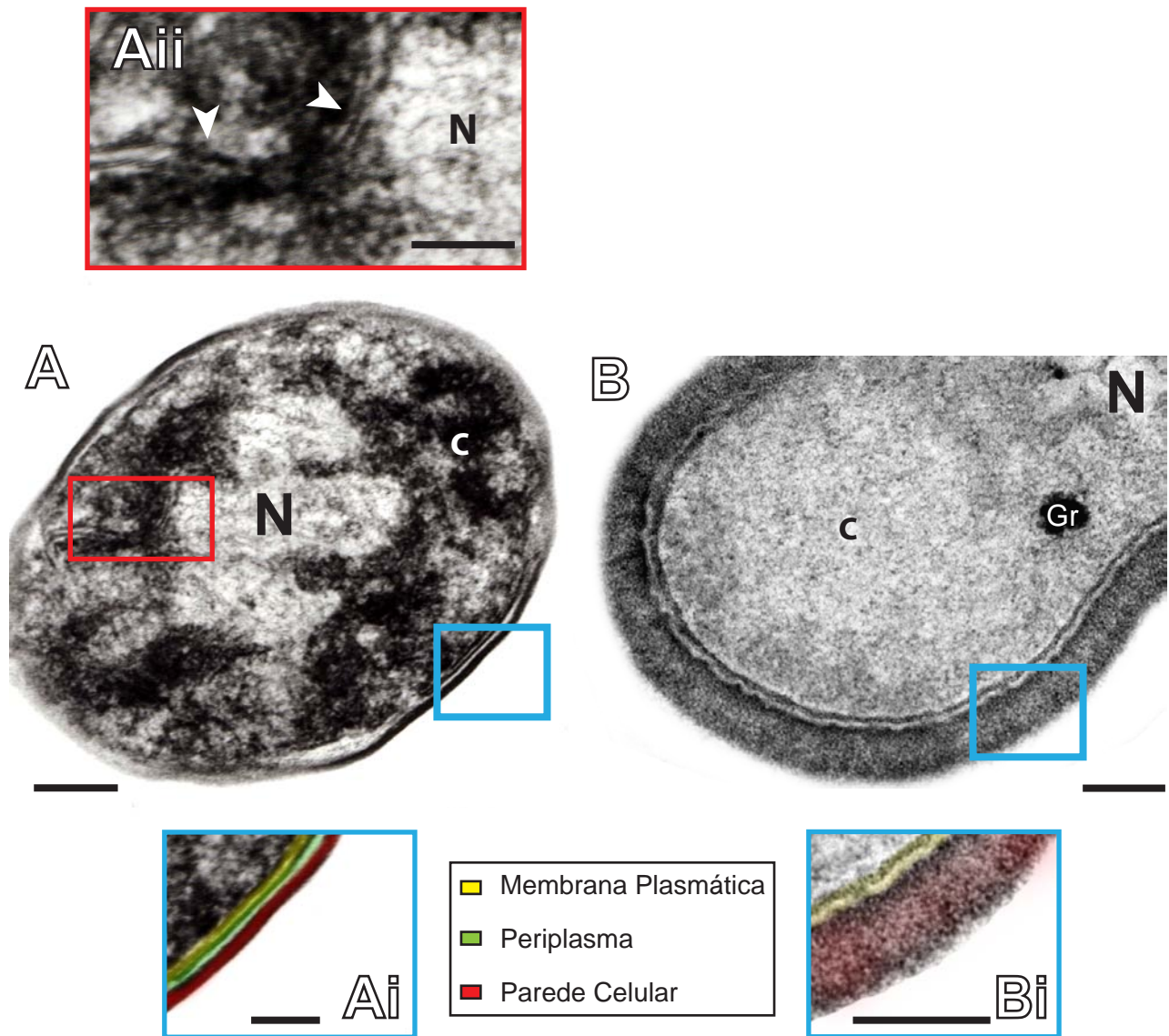
Bactérias podem interagir com partículas vivas e não vivas do meio aquático (Grossart, 2010; Suter, Juhl *et al.*, 2011). No presente trabalho, a frequência de bactérias com partículas aderidas foi investigada. A tabela 5 mostra a porcentagem de bactérias com ou sem partículas aderidas, em relação à integridade ultraestrutural. Observou-se que partículas do meio associavam-se, predominantemente, com bactérias não alteradas ou que não perderam completamente sua integridade ultraestrutural (intactas e danificadas – 40%). Interação entre bactérias não intactas foi também claramente visualizada (Fig. 14 A - retângulos).

Tabela 5 - Frequência de bactérias com e sem partículas aderidas em relação à integridade celular

| Integridade Celular | Aderidas (%) | Não Aderidas (%) |
|---------------------|--------------|------------------|
| Intactas            | 17,14        | 25,72            |
| Danificadas         | 22,86        | 8,57             |
| Vazias              | 11,42        | 14,29            |
| <b>Total</b>        | 51,42        | 48,58            |

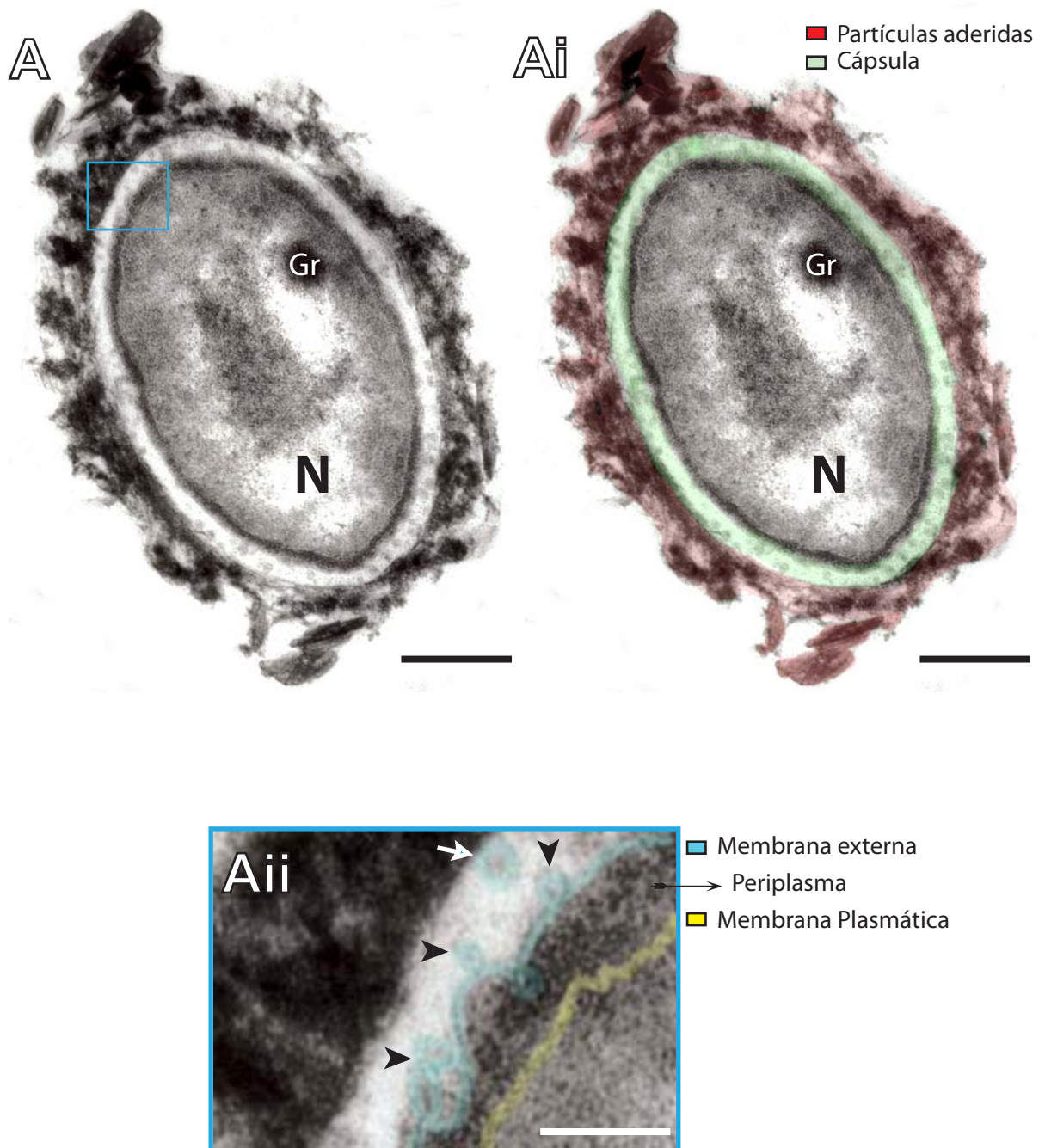
#### 4.3.2.2 Partículas virais x integridade ultraestrutural

É comum encontrar vírus infectando bactérias em ecossistemas aquáticos (Fuhrman e Noble, 1995; Sawstrom, Pearce *et al.*, 2008; Barros, Farjalla *et al.*, 2010). No presente trabalho, as análises por MET das amostras da área impactada do lago Batata revelaram que 34,28% das bactérias apresentam partículas virais (Fig. 14 A2 e Fig. 15 A). O número médio de fagos por secção nas bactérias intactas foi de  $0,93 \pm 0,80$ , e nas bactérias danificadas e vazias foi de  $9,0 \pm 5,11$  e  $16,11 \pm 8,59$ , respectivamente. A análise de variância mostrou que não há diferença significativa quanto ao número médio de fagos por secção entre as bactérias intactas, danificadas e vazias ( $p=0,0785$ ,  $f=2,751$ ). Porém, o número médio de fagos por secção foi significativamente menor nas bactérias intactas em comparação com as não intactas (danificadas em conjunto com as vazias) ( $p<0,05$ ; Fig.15 B).

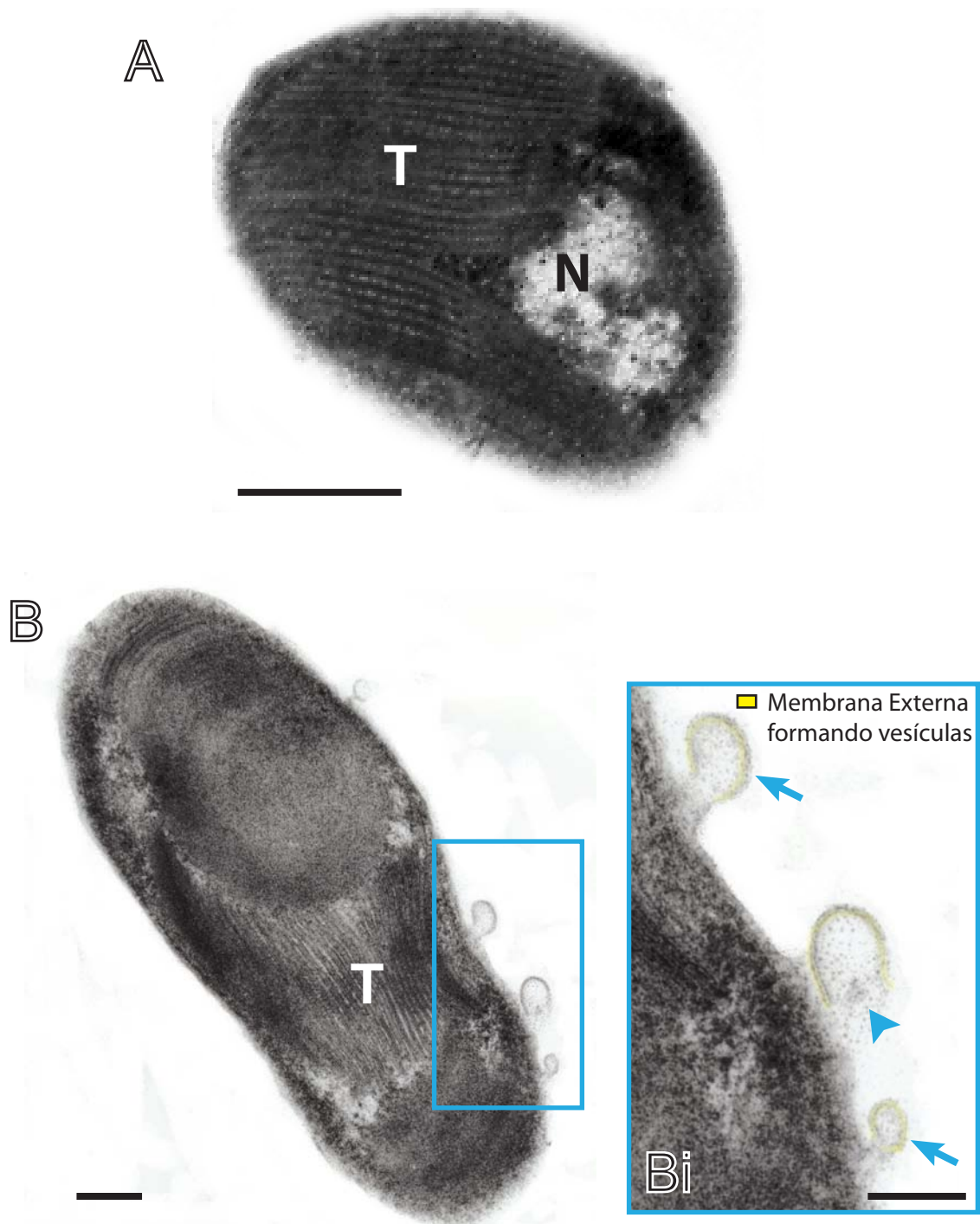


**Figura 11 – Ultraestrutura de bactérias aquáticas do lago Batata – área impactada, observadas à microscopia eletrônica de transmissão. (A e B) Bactérias intactas, apresentando estruturas típicas como nucleóide (N), grânulo (Gr), e envoltórios celulares com diferentes espessuras (retângulos azuis). Em (Ai) e (Bi) são mostrados detalhes do envoltório celular. Em (Ai) o envoltório é delgado, composto por parede celular, periplasma e membrana plasmática. Em (Bi), o envoltório celular mostra-se mais espesso, composto por membrana plasmática e parede celular. Em (Aii), observam-se sistemas de endomembranas denominados mesossomos (cabeças de setas) em íntima relação com o nucleóide (N). Note a diferença de elétrons-densidade do citoplasma (c), elétrons-denso em (A) e uniformemente elétrons-lúcido em (B). Barra = 240nm (A), 120 nm (Ai), 140nm (Aii) e 70 nm (B e Bi).**

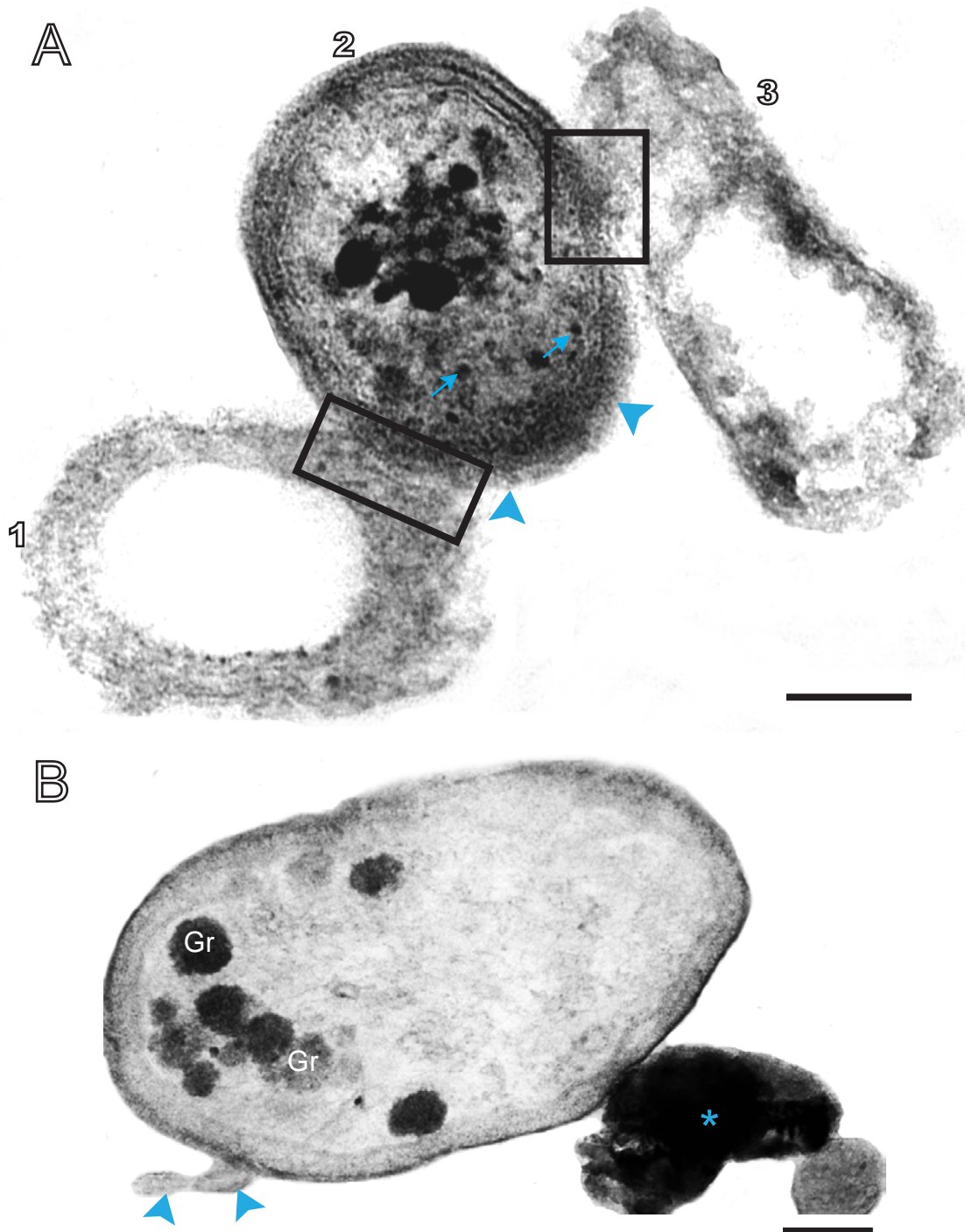




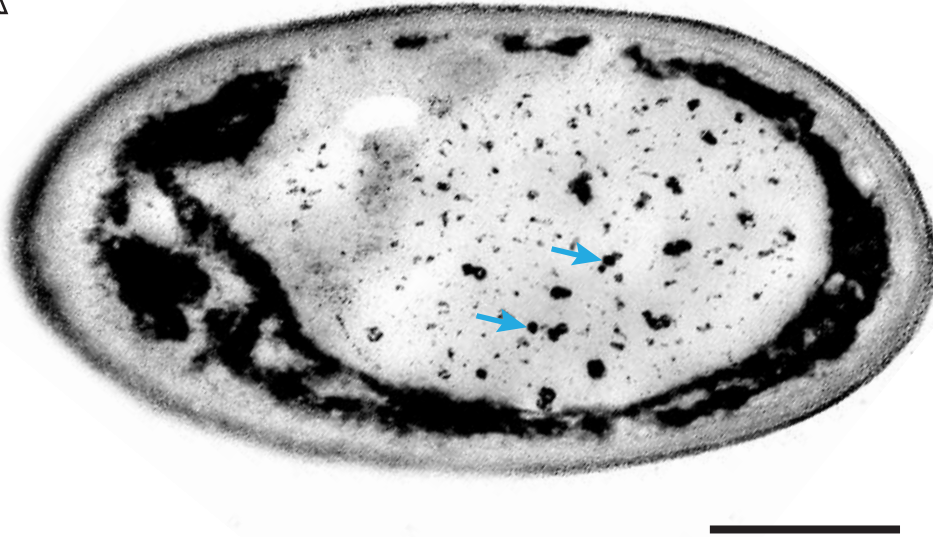
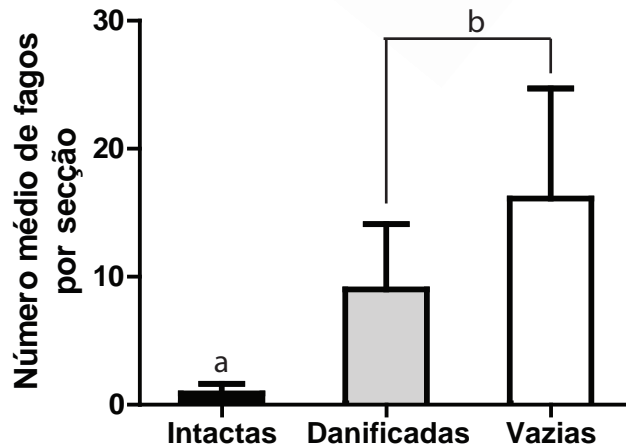
**Figura 12 – Bactéria aquática de vida livre mostrando cápsula e partículas aderidas do meio.** Em (A) observa-se a estrutura capsular (colorida em verde em (Ai) e camada de partículas aderidas (colorida em vermelho em Ai), além do nucleóide (N) e grânulo citoplasmático (Gr). Note no detalhe (Aii), o envoltório celular composto por membrana plasmática, periplasma, membrana externa e cápsula. Observam-se vesículas membranosas projetando da membrana externa (cabeças de seta) em direção à cápsula (seta). Amostras foram coletadas, fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Barra = 130nm (A, Aii) e 60nm (Aii).



**Figura 13 – Bactérias aquáticas de vida livre com tilacóides, observadas à microscopia eletrônica de transmissão.** (A e B) Endomenbranas com morfologia típica de tilacóides (T) são observadas em secção transversal (A) e longitudinal (B) de bactérias. Note no detalhe (Bi), a formação de vesículas a partir da membrana externa bacteriana (seta), bem como a liberação do conteúdo vesicular no meio (cabeça de seta). A estrutura trilaminar da membrana é nitidamente observada. (N) nucleóide. Barra = 275nm (A), 255nm (B) e 190nm (Bi).



**Figura 14 - Bactérias aquáticas do lago Batata – área impactada – com alterações da integridade celular.** Em (A) observam-se 2 bactérias vazias com perda total da integridade celular (1,3) e uma bactéria parcialmente danificada (2) com desestruturação do envoltório celular (cabeças de setas), retração citoplasmática e presença de partículas virais no citoplasma (setas). Áreas de íntima associação entre bactérias são indicadas (retângulos). Em (B), nota-se uma bactéria danificada com rarefação citoplasmática, alteração do envoltório celular (cabeças de seta) e agrupamento de grânulos (Gr). Parte destes grânulos mostra-se aparentemente em processo de dissolução. Uma partícula de substrato (\*) é vista aderida à superfície da bactéria. Amostras foram coletadas, fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Barra = 50nm (A) e 70nm (B).

**A****B**

**Figura 15 - Bactérias aquáticas do lago Batata – área impactada - infectadas com vírus bacteriófagos.** Em (A) observa-se bactéria com perda total da integridade ultra-estrutural e partículas virais no citoplasma (setas). Nota-se no citoplasma desta célula regiões amorfas, fortemente elétron-densas e condensadas. Em (B), é representado o número médio de fagos por seção em cada categoria de bactéria. Amostras foram coletadas, fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ( $p < 0,05$ ). Barra = 30nm (A).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 MORTE CELULAR DE BACTÉRIAS DE VIDA LIVRE EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

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

O uso do kit LIVE/DEAD *BacLight* é particularmente indicado para avaliação da viabilidade celular em microorganismos e tornou-se muito usual nos últimos anos devido ao seu procedimento prático e rápida distinção entre células viáveis e não viáveis (Decamp e Rajendran, 1998). Este kit vem sendo utilizado em vários estudos para determinar a viabilidade/inviabilidade, ou seja, vida/morte de bactérias em diversos ambientes aquáticos naturais (Decamp e Rajendran, 1998; Boulos, Prevost *et al.*, 1999; Haglund, Lantz *et al.*, 2003; Freese, Karsten *et al.*, 2006). No entanto, é a primeira vez que este método foi usado para avaliar a viabilidade celular bacteriana nos modelos de ecossistemas aquáticos tropicais estudados – lago Batata e lago dos Manacás.

As análises de viabilidade celular do presente estudo mostraram que a morte celular de bactérias de vida livre é um processo de ocorrência geral nos ecossistemas aquáticos tropicais investigados. Apesar de diversos estudos realizados previamente nestes sistemas terem demonstrado que a densidade de bactérias altera em função da disponibilidade e qualidade dos substratos orgânicos, pulso de inundação, predação e infecção por vírus (Bozelli, 1994; Anésio, Abreu *et al.*, 1997; Farjalla, Azevedo *et al.*, 2006; Barros, Farjalla *et al.*, 2010), indicando ocorrência indireta de morte bacteriana, nossos resultados mostram diretamente a presença de bactérias vivas/viáveis e mortas/inviáveis.

Conforme ressaltado na introdução, a morte celular de bactérias aquáticas representa um processo importante para a regulação da abundância da comunidade bacteriana, com significado na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas (Lindeman, 1942; Novitsky, 1986; Fuhrman, 1999; Pomeroy, Williams *et al.*, 2007; Kiersztyn, Siuda *et al.*, 2011).

Além de documentar a ocorrência de morte celular bacteriana, os resultados do presente trabalho mostraram que: i) o total de bactérias viáveis é maior que o de bactérias não viáveis nos três sistemas estudados e, ii) a porcentagem média de morte celular varia entre 20-40% considerando os três sistemas.

É bem documentada a existência de um contínuo de estados fisiológicos entre vida e morte bacteriana em ecossistemas aquáticos e uma grande variabilidade em termos de bactérias viáveis e não viáveis, dependendo de diversos fatores como heterogeneidade das populações bacterianas, estresses ambientais, competição por nutrientes e predação (Joux e Lebaron, 2000; Smith e Del Giorgio, 2003; Sawstrom, Pearce *et al.*, 2008; Romanova e Sazhin, 2011). Estudos anteriores utilizando o mesmo método de análise do presente trabalho mostraram ampla variação de bactérias viáveis em comparação com o total de bactérias. Em ecossistemas marinhos, a porcentagem de bactérias viáveis variou de 40 a 85% (Decamp e Rajendran, 1998) enquanto em ecossistemas de água doce temperados a variação é de 13,5 a 83,5% (Sawstrom, Pearce *et al.*, 2008).

Nossos resultados também demonstraram que o lago Batata apresenta maior proporção de morte celular bacteriana em comparação com o lago dos Manacás. Embora a análise da morte celular em função do ecossistema estudado não tenha sido objetivo do presente trabalho e sim usar os ecossistemas como modelos para se estudar o processo de morte bacteriana, algumas considerações podem ser feitas. O lago Batata é um ecossistema aquático amazônico de inundação que foi impactado pelo despejo de rejeitos de bauxita, provenientes da atividade mineradora na região e é considerado um sistema impactado em recuperação. Já o lago dos Manacás é um ecossistema aquático artificial que recebe resíduos sólidos provenientes do seu entorno (Lawall, Torres *et al.*, 2005). No entanto, o impacto sofrido pelo lago Batata é considerado único e sem precedentes (Esteves, 2000). Vários parâmetros limnológicos encontram-se afetados pelo despejo de bauxita, dentre eles o crescimento, a produção e a densidade bacteriana (Anésio, Abreu *et al.*, 1997), o que poderia explicar a maior ocorrência de morte neste ecossistema em comparação com o lago dos Manacás. Nossos dados, no entanto, não mostraram diferenças na proporção de morte bacteriana quando as áreas natural e impactada do lago Batata foram comparadas. Isto pode ser devido ao fato das coletas terem sido feitas em diferentes épocas do ano e não em períodos específicos. Sabe-se

que a população bacteriana flutua de acordo com o pulso de inundação do lago, o qual é baseado em períodos de enchente, águas altas, águas cheias e águas baixas. E esta variação do nível hidrológico exerce controle importante sobre a abundância de bactérias, influenciando na densidade e produção bacteriana (Farjalla, Azevedo *et al.*, 2006).

Com relação à importância das análises de viabilidade celular para o entendimento da dinâmica de populações bacterianas em ecossistemas aquáticos, 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 bactérias vivas e mortas são fundamentais para determinação do estatus fisiológico das células. Por outro lado, avaliações quantitativas do número de bactérias aquáticas usando-se marcadores que não distinguem bem entre células vivas e mortas poderão incluir bactérias mortas no total de bactérias do sistema e, desta forma, interferir na interpretação dos resultados (Seo, Ahn *et al.*, 2010).

Cabe ainda ressaltar com relação à técnica utilizada para as análises de viabilidade, que o processamento das amostras foi feito com uso de citocentrifugação. Em trabalhos anteriores do Grupo, o método de citocentrifugação para preparação das lâminas proporcionou melhor visualização de microorganismos quando comparado ao método usual (contagem de bactérias sobre a superfície de filtros, após filtração) para análise quantitativa à microscopia de luz (Noyma, Melo *et al.*, 2009). No caso da citocentrifugação, as bactérias são visualizadas e contadas diretamente sobre a superfície da lâmina, evitando a formação de background (muito comum em preparações com filtro), além de permitir a preparação rápida das amostras.

## 5.2 MORTE CELULAR PROGRAMADA EM BACTÉRIAS

Para entendimento do processo de morte celular bacteriana foi feita, em paralelo, a análise de fragmentação de DNA por citometria de fluxo, com utilização do APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit (Molecular Probes). A massiva fragmentação nas

dupla-fitas de DNA é um indicativo de morte celular, e pode ocorrer por várias causas, durante a morte de microrganismos (Fernandez, Cartelle *et al.*, 2008).

A positividade para o ensaio TUNEL é utilizada como indicador de morte celular programada por apoptose em organismos eucariotos (Taylor, Cullen *et al.*, 2008) e também tem sido aplicada para avaliação de morte celular por apoptose em procariotos e bactérias (Ning, Guo *et al.*, 2002; Fernandez, Cartelle *et al.*, 2008; Rice e Bayles, 2008). A NCCD argumenta em suas três revisões sobre morte celular que a fragmentação de DNA não ocorre somente no processo de morte por apoptose, porém reconhece que a fragmentação de DNA pode ser um importante indicador de sua ocorrência (Kroemer, El-Deiry *et al.*, 2005; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009; Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram que a morte celular programada constitui um fenômeno presente nos ecossistemas aquáticos estudados. Houve diferenças significativas entre as porcentagens de DNA fragmentado nos três ecossistemas em comparação com os controles negativos. Desta forma, sugere-se que a morte celular programada ocorra como mecanismo de morte governando o controle da comunidade bacteriana. De fato, dados da literatura em bactérias patogênicas e saprófitas em cultura mostram que esse processo de morte pode ser importante para população bacteriana na eliminação de células danificadas, infectadas por vírus ou durante processos de desenvolvimento (Smith e Foster, 1995; Lewis, 2000; Pang, Moussa *et al.*, 2011). A MPC em bactérias poderia também promover benefícios nutricionais para coespécíficos em situações de escassez de nutrientes (Aizenman, Engelberg-Kulka *et al.*, 1996).

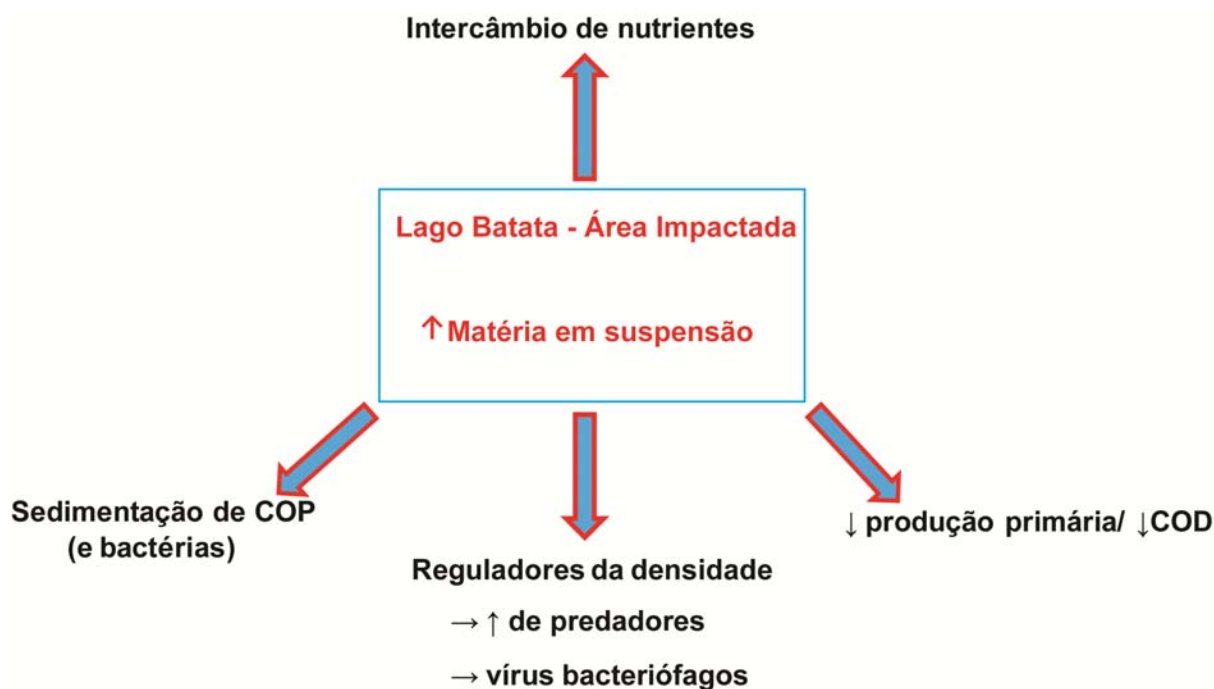
Um resultado interessante do presente trabalho foi a observação de maior ocorrência de MCP na estação impactada do lago Batata. Embora não existam dados na literatura sobre incidência de MCP em bactérias presentes em ecossistemas aquáticos submetidos a estresse ambientais, diversos estudos demonstram MCP em bactérias parasitas. Neste caso, demonstrou-se fragmentação de DNA durante a morte de *Xantomonas campestris* (Gautam e Sharma, 2002), *Heliobacter pylori* (Cellini, Robuffo *et al.*, 2001) e *E. coli* (Rohwer e Azam, 2000) submetidas a fatores estressantes no meio e/ou privação de nutrientes.

Na realidade, ainda não existem trabalhos realizados anteriormente que avaliem a fragmentação de DNA em bactérias aquáticas. Porém, foi documentado



DNA fragmentado associado a características típicas de MCP em alguns gêneros de cianobactérias (Ning, Guo *et al.*, 2002; Berman-Frank, 2004; Hu, Zhou *et al.*, 2010). Sugere-se que a MCP em procariotos possa funcionar como um mecanismo de auto-sacrifício, poupando nutrientes e garantindo a sobrevivência da população como um todo (Rice e Bayles, 2003).

Apesar do estudo de aspectos ecológicos do lago Batata e lago dos Manacás não ter sido objetivo deste trabalho, podemos inferir que a maior ocorrência morte celular com fragmentação de DNA, característica de MCP, na área impactada do lago Batata poderia ser um dos mecanismos de sobrevivência da comunidade bacteriana neste ambiente. Sugere-se que este mecanismo atue na morte de algumas células em benefício da população, refletindo em ganho adaptativo para comunidade. O lago Batata é um ecossistema aquático amazônico de águas claras, caracterizado pela pouca quantidade de matéria em suspensão (Sioli, 1984). Ecossistemas aquáticos amazônicos no geral possuem elevadas concentrações de nutrientes, em comparação com outros ecossistemas. Porém a estação impactada apresenta maior quantidade de matéria em suspensão, pela presença do rejeito de bauxita sobre o sedimento natural, o que impede o intercâmbio de nutrientes na coluna d'água (Roland e Esteves, 1993). As partículas do rejeito de bauxita também induzem a sedimentação de COP (e bactérias) e a diminuição da produção primária, pela redução da penetração de luz, reduzindo a quantidade de COD (Esteves, Thomas *et al.*, 1994; Ferrao-Filho e Esteves, 1994), que é utilizado pelas bactérias. O que caracteriza uma disponibilidade de nutrientes diferenciada nesta área, somada a presença de outros fatores controladores da abundância bacteriana, como a ocorrência de maior densidade de predadores (Bozelli, 1994) e considerável presença de vírus bacteriófagos (Barros, Farjalla *et al.*, 2010). Desta forma, a maior proporção de MCP na área impactada do lago Batata pode estar associada a estratégias populacionais em resposta a fatores de estresses e pressões ambientais (Lewis, 2000; Cellini, Robuffo *et al.*, 2001; Ning, Guo *et al.*, 2002; Berman-Frank, 2004). A área impactada do lago Batata mostra-se, portanto, uma área intrigante para estudos relacionados à morte celular de bactérias e seu significado ecológico. No entanto, outros estudos focados especificamente nesta estação são necessários para compreensão dos mecanismos intrínsecos de morte acompanhando os diferentes padrões limnológicos existentes de acordo com ciclo hidrológico do lago.



**Figura 16 – Esquema representativo das condições limnológicas diferenciadas presentes no lago Batata – área impactada.** A maior quantidade de matéria em suspensão encontrada na área impactada do lago Batata dificulta o intercâmbio de nutrientes na coluna d'água; induz a sedimentação de carbono orgânico particulado, incluindo as bactérias; dificulta a penetração da luz, o que ocasiona a diminuição da produção primária e diminuição do carbono orgânico dissolvido. Também se encontram presentes outros fatores reguladores da densidade bacteriana, como a presença de predadores, que em comparação com a área natural são mais abundantes, além da considerável presença de vírus bacteriófagos.

### 5.3 ULTRAESTRUTURA DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS

Conforme mencionado anteriormente, amostras do lago Batata foram processadas para MET tendo em vista que este ecossistema mostrou maior incidência de morte bacteriana em comparação com o lago dos Manacás e que a estação impactada do lago Batata apresentou maior proporção de MCP em comparação não apenas com o lago dos Manacás, mas também quando comparada com a área natural. Desta forma, utilizamos a MET como ferramenta para entender melhor aspectos morfológicos ultraestruturais da população bacteriana da estação impactada do lago Batata, assim como possíveis alterações ultraestruturais relacionadas com morte de bactérias. Ressalta-se que a MET é frequentemente utilizada para estudo de estruturas de células bacterianas em ambientes naturais e culturas (Moriarty e Hayward, 1982; Hoppert e Mayer, 1999; Kerfeld, Heinhorst *et al.*, 2010). No entanto, não foram encontrados dados na literatura referentes a estudos

ultraestruturais de bactérias aquáticas nos ecossistemas estudados no presente trabalho.

### 5.3.1 Diversidade Ultraestrutural

As análises de MET revelaram bactérias aquáticas apresentando estruturas típicas comumente encontradas em bactérias, como: nucleóide, membrana plasmática, parede celular e grânulos citoplasmáticos. No entanto, chamou atenção a grande diversidade ultraestrutural de bactérias na estação impactada do lago Batata, representada por diferenças morfológicas quanto às estruturas bacterianas observadas.

No presente trabalho, foi possível observar diferenças evidentes quanto às espessuras e composição de envoltórios celulares bacterianos. Estas diferenças refletem a presença de bactérias gram-positivas e gram-negativas comumente encontradas em ecossistemas aquáticos (Moriarty e Hayward, 1982; Beveridge, 1999; Nevot, Deroncelle *et al.*, 2006). Estruturas capsulares, com ampla variação em sua espessura (10,7-117nm), estavam presentes em parte das bactérias analisadas (31,43%). As cápsulas são conhecidas por mediar interações entre as células e o ambiente, constituindo uma estrutura que permite não apenas a absorção e estocagem de nutrientes (Roberts, 1996), mas também a retenção de agentes tóxicos do meio e proteção à predação (Hahn, Lunsdorf *et al.*, 2004). Estudos prévios em bactérias marinhas descreveram freqüência de cápsula em 7-27% das bactérias e relacionaram sua ocorrência com o nível de atividade bacteriana (Cowen, 1992; Heissenberger, Leppard *et al.*, 1996; Stoderegger e Herndl, 2001).

Uma observação interessante foi a presença de vesículas membranosas secretoras em algumas bactérias, formadas a partir da membrana externa. Estas vesículas projetavam-se para cápsula adjacente ou meio extracelular, onde descarregavam seus produtos. Estudos indicam que estas vesículas de membrana externa apresentam conteúdo variado e podem ser essenciais na sobrevivência bacteriana e inibição da lise por infecção viral (Kulp e Kuehn, 2010). Estas vesículas podem conter componentes variados que auxiliam na formação da parede celular, inibem compostos tóxicos do meio (Mcbroom e Kuehn, 2007) e favorecem a formação e estabelecimento de biofilmes (Schooling e Beveridge, 2006). Além disso,

podem conter enzimas que contribuem para aquisição de nutrientes (Thompson, Naidu *et al.*, 1985) e autolisinas que degradam outras bactérias, o que poderia favorecê-las na competição por nichos (Li, Clarke *et al.*, 1998).

Sistemas de endomembranas também foram observados em algumas bactérias. Mesossomos foram verificados em íntima relação com o nucleóide e uma pequena proporção de bactérias apresentaram sistemas de tilacóides. Os mesossomos parecem ter papel em diversas funções celulares, principalmente na segregação de cromossomos durante a divisão celular. Estudos documentam a formação de mesossomos em bactérias patogênicas sob condições de estresse (Santhana Raj, Hing *et al.*, 2007; Li, Feng *et al.*, 2008). Os tilacóides são estruturas membranosas importantes na realização de processos metabólicos, como a fotossíntese e são encontradas em cianobactérias (Miller, Augustine *et al.*, 2005) e algumas bactérias (Mcdermott, Prince *et al.*, 1995; Yurkov e Beatty, 1998). Interessantemente, tilacóides podem sofrer o efeito da radiação ultra-violeta, conforme demonstrado em trabalho recente do Grupo em cianobactérias. Estes estudos mostraram redução da área de tilacóides e pigmentos acessórios da fotossíntese.

A alta complexidade e variação espaço-temporal da disponibilidade de matéria orgânica em ecossistemas aquáticos facilita a evolução de um amplo repertório de adaptações fisiológicas das bactérias aos ambientes (Azam, 1998; Grossart e Tang, 2010). Portanto a grande diversidade ultraestrutural pode estar relacionada à ampla diversidade metabólica e adaptativa bacteriana existente. Esta diversidade encontrada na área impactada do lago Batata pode representar adaptações metabólicas e fisiológicas presentes neste ambiente.

Finalmente, ressalta-se que a diversidade morfológica bacteriana vai, portanto, muito mais além do que a simples descrição da forma bacteriana. Os resultados aqui descritos enfatizam o fato das bactérias aquáticas constituírem organismos complexos do ponto de vista ultraestrutural o que denota também a complexidade funcional destes microorganismos.

### 5.3.2 Integridade Ultraestrutural e Morte Celular

Bactérias aquáticas da estação impactada do lago Batata foram analisadas e categorizadas de acordo sua integridade ultraestrutural em intactas, danificadas ou vazias (Heissenberger, Leppard *et al.*, 1996). Estes autores assumem que somente bactérias com estruturas internas intactas podem ser consideradas potencialmente ativas. De fato, um dos parâmetros utilizados para caracterizar células vivas e viáveis é a presença de estruturas celulares morfologicamente identificáveis (Nebe-Von Caron e Badley, 1995). Por outro lado, alterações estruturais são indicativas de danos celulares que podem anteceder processo de morte (Heissenberger, Leppard *et al.*, 1996).

É amplamente aceito que comunidades naturais de bactérias aquáticas são constituídas por células que podem variar amplamente o seu estado metabólico, desde vivas e ativas até dormentes ou mortas (Schumann, Schiewer *et al.*, 2003; Smith e Del Giorgio, 2003). Portanto, considerando a morte como um processo, bactérias com estruturas intactas podem ser consideradas vivas, bactérias vazias mortas e as que apresentaram estruturas internas ou envoltório celular danificados, poderiam representar bactérias em processo de morte.

De acordo com as análises de integridade ultraestrutural, a maioria das bactérias analisadas por MET mostraram-se com alterações morfológicas indicativas de morte ou processo de morte (danificadas e vazias, respectivamente), constituindo um total de 57,14%. Este valor, embora maior, corrobora os dados de viabilidade celular demonstrados pelas contagens por microscopia de fluorescência usando o marcador *BackLight* (40%). A diferença encontrada poderia ser justificada pelo fato da MET ser capaz de identificar alterações iniciais de estruturas celulares. O fato é que nossos estudos por MET identificaram uma porcentagem alta de bactérias alteradas morfologicamente, o que pode ter significado importante para se entender a dinâmica da população bacteriana em ecossistemas aquáticos. Realmente, estudos anteriores demonstraram que bactérias não intactas constituem a maior fração do bacterioplâncton marinho. Heissenberger, Leppard *et al.* (1996) encontraram 42% de bactérias danificadas e 23% vazias e Zweifel e Hagstrom (1995) concluíram que a maior fração (68 a 98%) das bactérias marinhas são “bacteria ghost” (não apresentam nucleóide) e que isto geralmente escapa da

observação dos microbiologistas pelas técnicas rotineiras de fixação e coloração que são utilizadas para contagem de bactérias.

Alterações morfológicas e bioquímicas indicativas de morte, principalmente as relacionadas a eventos de MCP em bactérias e cianobactérias, vem sendo discutidas com base nas alterações encontradas em células eucarióticas (Kusters, Gerrits *et al.*, 1997; Miguélez, Hardisson *et al.*, 1999; Ning, Guo *et al.*, 2002; Rice e Bayles, 2003; Berman-Frank, 2004).

Várias alterações ultraestruturais encontradas em bactérias de vida livre no presente trabalho são similares às descritas em células eucarióticas. Estas alterações incluem retração, rarefação e condensação citoplasmáticas, sendo a retração e condensação celulares características típicas de apoptose (Ziegler e Groscurth, 2004; Kroemer, El-Deiry *et al.*, 2005; Galluzzi, Vitale *et al.*, 2012). Curiosamente, foram encontradas bactérias que apresentaram conteúdo esvaziado e mantiveram envoltório celular intacto. Durante a apoptose de células eucarióticas a membrana plasmática permanece intacta até estágios tardios do processo (Ziegler e Groscurth, 2004; Kroemer, El-Deiry *et al.*, 2005; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009).

Avaliando a presença de cápsula nas diferentes categorias de integridade ultraestrutural verificou-se no presente estudo que a frequência de ocorrência de cápsula é menor nas bactérias vazias (22,2%). Este resultado corrobora com Heissenberger, Leppard *et al.* (1996), que observou que 80% das bactérias vazias não apresentaram cápsula, e concluiu que em células não integras a estrutura capsular é perdida.

Nossos resultados também demonstraram que partículas do meio associavam-se, predominantemente, com bactérias que não perderam completamente sua integridade ultraestrutural (intactas e danificadas). Grossart (2010) afirma que a relação bactérias-partículas do meio pode ser considerada uma estratégia para minimizar o tempo de privação de nutrientes e aumentar a eficiência para exploração de matéria orgânica e energia. O incremento de partículas em suspensão na estação impactada do lago Batata ocorre pelo impacto antrópico provocado pelo despejo de rejeitos de bauxita e tem relação com o pulso hidrológico do lago (Anésio, Abreu *et al.*, 1997). Esta área impactada também apresenta alta biomassa de zooplâncton, que pode exercer um controle descendente na comunidade bacteriana através da predação (Bozelli, 1994). Bactérias com

partículas associadas podem ter aumento na produção (Crump, Baross *et al.*, 1998) e diferentes suscetibilidades à predação (Davies e Bavor, 2000). Portanto, a relação com partículas pode representar outra estratégia de sobrevivência à disponibilidade de nutrientes e proteção à predação nesta estação do lago.

Um aspecto interessante revelado pelas análises por MET de bactérias da estação impactada do lago Batata foi a visualização de bactérias infectadas por vírus bacteriófagos. Os resultados do presente trabalho indicam que 34,28% das bactérias apresentaram partículas virais, e o número médio de fagos por secção foi menor nas bactérias intactas (vivas) em comparação com as não intactas. Isto significa uma relação importante entre vírus e morte de bactérias aquáticas na área impactada do lago Batata. A infecção por vírus pode levar ao rompimento (lise), com consequente morte da bactéria. Interessantemente, trabalho recente demonstrou que os vírus, mesmo no ciclo lítico, podem controlar a lise celular, por mecanismos de ativação de proteínas de membrana semelhantes a proteínas reguladoras de apoptose (Bak/Bax) em células eucarióticas (Pang, Moussa *et al.*, 2011). Durante o período de latência da infecção, proteínas “holin”, acumulam na membrana citoplasmática até que de acordo com um programa geneticamente controlado pelo vírus, estas proteínas produzem buracos grandes o suficiente para passagem de endolisinas, que clivam a parede celular e liberam os fagos (Pang, Moussa *et al.*, 2011). Proteínas “antiholin” inibem a formação de poros na membrana bacteriana e evitam a lise celular prematura. Através de controles genéticos regulados das proteínas “holin/antiholin”, os vírus bacteriófagos controlam o tempo de lise da bactéria hospedeira e a consequente liberação dos fagos no meio extracelular (Young, 2002; Rice e Bayles, 2003). Este mecanismo programado se assemelha ao controle da permeabilidade de membrana mitocondrial, pelas proteínas bak/bax e bcl2 durante a apoptose em células eucarióticas (Young, 2002; Rice e Bayles, 2003; Rice e Bayles, 2008; Pang, Moussa *et al.*, 2011).

Além disso, a presença de vírus observada no interior de bactérias pode representar ciclo lisogênico, onde não ocorre lise da célula hospedeira (Weinbauer, 2004). Durante este tipo de ciclo os vírus entram em estágio de dormência (prófagos) e passam a fazer parte do genoma do hospedeiro, acompanhando seu desenvolvimento e multiplicação, até a indução do ciclo lítico e consequente lise celular. Prófagos lisogênicos podem entrar no ciclo lítico sobre determinadas

condições adversas, como quando ocorrem danos no DNA bacteriano (Weinbauer, 2004).

Trabalho anterior do Grupo de Biologia Celular e do Grupo em Ecologia Aquática da UFJF no Lago Batata demonstrou uma correlação importante entre bactérias de vida livre e vírus (Barros, Farjalla *et al.*, 2010). Estes autores encontraram uma média de  $10.0 \pm 3.5$  fagos por secção na análise ultraestrutural de bactérias e demonstraram que a turbidez e o pulso hidrológico influenciam na abundância de bactérias e vírus. Além disso, os resultados indicam que a maioria dos vírus são bacteriófagos e atuam na regulação da abundância bacteriana (Barros, Farjalla *et al.*, 2010).

#### 5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, com base nos resultados encontrados no presente trabalho, em conjunto, foram detectadas as seguintes alterações celulares que podem ser comparadas a alterações que ocorrem em células eucarióticas durante eventos de MCP: (i) retração citoplasmática, (ii) rarefação do citoplasma, (iii) presença de estruturas alteradas, (iv) condensação citoplasmática, (v) aumento permeabilidade de membrana representando possível perda do potencial de membrana, (vi) fragmentação de DNA e (vii) células mortas com presença de membrana intacta.

Vale ressaltar que o presente trabalho constitui o primeiro estudo que investiga a ocorrência de morte e sua relação com eventos programados em bactérias de ecossistemas aquáticos tropicais. A MCP em bactérias tem papel e significado complexo relacionado a estratégias de sobrevivência e adaptação de comunidades bacterianas. Implica na cooperação coordenada das populações bacterianas, através de comunicações intercelulares, já que é um mecanismo complexo e altamente regulado (Lewis, 2000). A ocorrência de MPC em bactérias aquáticas abre novas perspectivas no entendimento da morte destes microrganismos, relacionados à sua fisiologia e papel ecológico nos ecossistemas aquáticos.



## 6 CONCLUSÕES

- As análises de viabilidade celular demonstraram que a morte celular de bactérias de vida livre é um processo de ocorrência geral nos ecossistemas aquáticos tropicais estudados. A maior proporção de morte celular bacteriana encontrada no lago Batata em comparação com o lago dos Manacás pode estar relacionada com o impacto sofrido neste ecossistema.
- A MCP, conforme indicada pela avaliação da fragmentação de DNA bacteriano, constitui um fenômeno presente nos 3 ecossistemas aquáticos estudados. A MCP pode significar mecanismo de morte governando o controle da comunidade bacteriana nestes ecossistemas. A maior ocorrência de MCP de bactérias na área impactada do lago Batata pode estar relacionada com estratégias adaptativas de sobrevivência da comunidade bacteriana às condições limnológicas diferenciadas, ocasionadas pelo impacto antrópico sofrido por este ecossistema.
- As análises ultraestruturais revelaram grande diversidade ultraestrutural de bactérias aquáticas no lago Batata-área impactada. Esta diversidade pode estar relacionada com a ampla diversidade metabólica e adaptativa bacteriana.
- Análises da integridade ultraestrutural no lago Batata – área impactada - encontraram maior proporção de bactérias mortas ou em processo de morte (vazias e danificadas) em comparação com bactérias intactas/viáveis. Além disso, foram encontradas nesta área do lago, alterações morfológicas indicativas de MCP de bactérias semelhantes a processos de apoptose em eucariotos. Estes resultados reforçam a importância dos mecanismos de morte atuando no controle da comunidade bacteriana.
- Ampliando a visão de trabalhos anteriores do Grupo que demonstraram relações importantes na interação vírus/bactéria (Barros, Farjalla *et al.*, 2010), os resultados do presente estudo reforçam também o papel dos vírus na morte de bactérias aquáticas na área impactada do lago Batata.

## REFERENCIAS

AIZENMAN, E.; ENGELBERG-KULKA, H.; GLASER, G. An Escherichia coli chromosomal "addiction module" regulated by 3',5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 6059-6063, 1996.

ALVAREZ, H. M. et al. Formation of intracytoplasmic lipid inclusion by Rhodococcus opacus strain PD630. **Arch. Microbiol.**, v. 165, p. 377-386, 1996.

ALVAREZ, H. M.; STEINBUHEL, A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 4, p. 367-76, Dec 2002.

AMEISEN, J. C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a time line of four billion years. **Cell Death Differentiation**, v. 9, p. 367-393, 2002.

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

ANÉSIO, A. M.; ABREU, P. C.; ESTEVES, F. A. Influence of the hydrological cycle on the bacterioplankton clear water amazonian lake. **Microb. Ecol.**, v. 34, p. 66-73, 1997.

ASHKENAZI, A. Death Receptors: Signaling and Modulation. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1305-1308, 1998.

AZAM, F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. **Science**, v. 280, p. 694-696, 1998.

AZAM, F. et al. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. **Marine Ecology - Progress Series**, v. 10, p. 257-263, 1983.

AZEVEDO, N. F. et al. Coccoid form of Helicobacter pylori as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 10, p. 3423-7, May 2007.

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

BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 582-587, 1999.

BAYLES, K. W. Are the molecular strategies that control apoptosis conserved in bacteria? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 306-311, 2003.

BAYLES, K. W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature reviews Microbiology**, v. 5, p. 721-726, 2007.

BELITSKY, M. et al. The Escherichia coli Extracellular Death Factor EDF Induces the Endoribonucleolytic Activities of the Toxins MazF and ChpBK. **Molecular Cell**, v. 41, n. 6, p. 625-635, 2011.

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

BERMAN-FRANK, I. The Demise of the Marine Cyanobacterium, Trichodesmium SPP., via an Autocatalyzed Cell Death Pathway. **Limnol. Oceanogr.**, v. 49, n. 4, p. 997-1005, 2004.

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

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

BIDLE, K. D.; FALKOWSKI, P. G. Cell death in planktonic, photosynthetic microorganisms. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 8, p. 643-55, 2004.

BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003.

BORTNER, C. D.; OLDENBURG, N. B. E.; CIDLOWSKI, J. A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 21-26, 1995.

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.

BOZELLI, R. L. Zooplankton Community Density in Relation to Water- Level Fluctuations and Inorganic Turbidity in an Amazonian Lake, Lago-Batata, State of Para, Brazil. **Amazoniana**, v. 13, n. 1, p. 17-32, 1994.

BRADLEY, D. E. Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. **Bacteriological Reviews**, v. 31, n. 4, p. 230-314, 1967.

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

CELLINI, L. et al. Searching the point of no return in *Helicobacter pylori* life: necrosis and/or programmed cell death? **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 727-732, 2001.

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

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

CRUMP, B. C.; BAROSS, J. A.; SIMENSTAD, C. A. Dominance of Particle-Attached Bacteria in the Columbia River Estuary, USA. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 14, n. 1, p. 7-18, 1998.

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

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell Press**, v. 116, p. 205-219, 2004.

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

DAVIES, C. M.; BAVOR, H. J. The Fate of Stormwater-Associated Bacteria in Constructed Wetland and Water Pollution Control Pond Systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 349-360, 2000.

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

DECHO, A. W.; NORMAN, R. S.; VISSCHER, P. T. Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. **Trends Microbiol**, v. 18, n. 2, p. 73-80, Feb 2010.

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

DEPONTE, M. Programmed cell death in protists. **Biochim Biophys Acta**, v. 1783, n. 7, p. 1396-405, Jul 2008.

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

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

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

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

ERHMANN, M. **The Periplasm**. Washinton, E.U.A.: ASM Press, 2007.

ESTEVEES, F. A. Princípios ecológicos para mitigação do impacto antrópico. In: BOZZELLI, R.;ROLAND, F., *et al* (Ed.). **Lago Batata - Impacto e Recuperação de um Ecossistema Amazônico**. Rio de Janeiro: IB-UFRJ/SLB, 2000.

ESTEVEES, F. A. et al. Comparison of metabolism of two floodplain lakes of the Trombetas River (Pará, Brazil) based on a study of diel variation. **Amazoniana**, v. XIII, p. 33-46, 1994.

FARJALLA, V. F. et al. Influence of hydrological pulse on bacterial growth and DOC uptake in a clear-water Amazonian lake. **Microb Ecol**, v. 52, n. 2, p. 334-44, Aug 2006.

FERNANDEZ, J. L. et al. DNA fragmentation in microorganisms assessed in situ. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 19, p. 5925-33, 2008.

FERRAO-FILHO, A.; ESTEVES, F. A. Nutritive value and sedimentation rates of particulate matter in the course of two flood pulses in an Amazonian Várzea lake. **Arch. Hydrobiol.**, v. 130, p. 325-337, 1994.

FITZ-JAMES, P. Participation of the cytoplasmic membrane in the growth and spore formation of Bacilli. **J. Biophys. Biochem.**, v. 8, p. 507-528, 1960.

FLETCHER, T. I. et al. Viability assays of intra-erythrocytic organisms using fluorescent dyes. **Vet Parasitol**, v. 163, n. 1-2, p. 144-7, Jul 7 2009.

FRANKLIN, D. J.; BRUSSAARD, C. P. D.; BERGES, J. A. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? **European Journal of Phycology**, v. 41, n. 1, p. 1-14, 2006. ISSN 0967-0262 1469-4433.

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.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742-58, 2011.

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

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

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 7, p. 1237-1243, Jul 2007.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 107-20, Jan 2012.

GAUTAM, S.; SHARMA, A. Involvement of caspase-3-like protein in rapid cell death of *Xanthomonas*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 393-401, 2002.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci**, v. 32, n. 1, p. 37-43, Jan 2007.

GRAY, K. M. Intercellular communication and group behavior in bacteria. **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 184-188, 1997.

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

GROSSART, H. P.; TANG, K. W. [www.aquaticmicrobial.net](http://www.aquaticmicrobial.net). **Commun Integr Biol**, v. 3, n. 6, p. 491-4, Nov 2010.

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

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

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

HAYES, F. Moving in for the kill: activation of an endoribonuclease toxin by a quorum-sensing peptide. **Molecular Cell**, v. 41, n. 6, p. 617-8, Mar 18 2011.

HEISSENBERGER, A.; LEPPARD, G. G.; HERNDL, G. J. Relationship between the Intracellular Integrity and the Morphology of the Capsular Envelope

in Attached and Free-Living Marine Bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, n. 12, p. 4521-4528, 1996.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

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

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

HU, L. B. et al. Cinnamaldehyde Induces PCD-Like Death of *Microcystis aeruginosa* via Reactive Oxygen Species. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 217, n. 1-4, p. 105-113, 2010.

HUSSAIN, S. G.; RAMAIAH, K. V. A. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. **Current Science**, v. 93, n. 12, p. 1684-1696, 2007.

JAFFE, A.; OGURA, T.; HIRAGA, S. Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth. **J. Bacteriol.**, v. 163, p. 841-849, 1985.

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

JUNK, W. J. The Use of Amazonian Floodplains under an Ecological Perspective. **Interciencia**, v. 14, p. 317-322, 1989.

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

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

KERR, J. F. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 90, n. 2, p. 419-435, 1965.



KIERSZTYN, B.; SIUDA, W.; CHROST, R. J. Persistence of bacterial proteolytic enzymes in lake ecosystems. **FEMS Microbiol Ecol**, 2011. ISSN 1574-6941 (Electronic) 0168-6496 (Linking).

KOLODKIN-GAL, I. et al. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in Escherichia coli. **Science**, v. 318, p. 652-655, 2007.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, v. 12 Suppl 2, p. 1463-1467, 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol. Rev.**, 2007.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

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

KUSTERS, J. G. et al. Coccoid forms of Helicobacter pylori are the morphologic manifestation of cell death. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3672-3679, 1997.

LAPA, R. P. A bauxita e o rejeito de bauxita. In: BOZZELLI, R. L. (Ed.). **Lago Batata: Impacto e Recuperação**. 1ª. Rio de Janeiro: IB-UFRJ/SBL, 2000. cap. 3, p.27-35.

LAWALL, S.; TORRES, F. T. P.; ROCHA, G. C. Diagnostic and proposal of recovery of the lake Manacás watershed, campus of the Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais. **Sociedade & Natureza**, v. especial, n. 1, p. 494-501, 2005.

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

LI, X. et al. Mesosome formation is accompanied by hydrogen peroxide accumulation in bacteria during the rifampicin effect. **Mol Cell Biochem**, v. 311, n. 1-2, p. 241-7, Apr 2008.

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

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

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 4, p. 643-649, 1964.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkmoth. **Journal of Insect Physiology**, v. 11, n. 2, p. 123-133, 1965.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. **Am. J. Path.**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MARTINEZ, M. M.; REIF, R. D.; PAPPAS, D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. **Analytical Methods**, v. 2, n. 8, p. 996-1004, 2010.

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

MCDERMOTT, G. et al. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. **nature**, v. 374, n. 6, p. 517-521, 1995.

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

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

MIGUÉLEZ, E. M.; HARDISSON, C.; MANZANAL, M. B. Hyphal Death during Colony Development in *Streptomyces antibioticus*: Morphological Evidence for the Existence of a Process of Cell Deletion in a Multicellular Prokaryote. **The Journal of Cell Biology**, v. 153, n. 3, p. 515-525, 1999.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, 2001.

MILLER, S. R. et al. Discovery of a free-living chlorophyll d-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 3, p. 850-5, Jan 18 2005.

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

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

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

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

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

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

NICOTERA, P.; BERNASSOLA, F.; MELINO, G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. **Cell Death Differ**, v. 6, p. 931-933, 1999.

- NICOTERA, P.; MELINO, G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. **Oncogene**, v. 23, n. 2757-2765, 2004.
- NING, S. B. et al. Salt stress induces programmed cell death in prokaryotic organism *Anabaena*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 15-28, 2002.
- NOVITSKY, J. A. Degradation of Dead Microbial Biomass in a Marine Sediment. **Appl Environ Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 504-511, 1986.
- NOYMA, N. P.; MELO, R. C. N.; ROLAND, F. **Avaliação da ultraestrutura e morte celular em *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cianobacteria) sob efeito da radiação ultravioleta**. 2009. (Dissertação de Mestrado). Pós Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.
- NUGROHO, F. A. et al. Characterization of a new sigma-K-dependent peptidoglycan hydrolase gene that plays a role in *Bacillus subtilis* mother cell lysis. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 20, p. 6230-6237, 1999.
- OLUKOSHI, E. R.; PACKTER, N. M. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces* : possible carbon source for antibiotics. **Microbiology**, v. 140, p. 931-943, 1994.
- PANG, X. et al. Active Bax and Bak are functional holins. **Genes Dev.**, v. 25, n. 21, p. 2278-2290, 2011.
- POGLIANO, J. The bacterial cytoskeleton. **Current opinion in cell biology**, v. 20, n. 1, p. 19-27, 2008.
- POMEROY, L. R. The ocean food web a changing paradigm. **Bioscience**, v. 24, p. 499-504, 1974.
- POMEROY, L. R. et al. The microbial loop. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 28-33, 2007.
- POP, C.; SALVESEN, G. S. Human caspases: activation, specificity, and regulation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 33, p. 21777-81, Aug 14 2009.

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

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

PROZOROV, A. A.; DANILENKO, V. N. Toxin-antitoxin systems in bacteria: Apoptotic tools or metabolic regulators? **Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 129-140, 2010.

RAJU, K. K.; MISRA, H. S.; SHARMA, A. Xanthomonas caspase displays an inherent PARP-like activity. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 272, p. 259-268, 2007.

REAPE, T.; MCCABE, P. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. **Apoptosis**, v. 15, n. 3, p. 249-256, 2010.

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

RIBEIRO, G. A. **Avaliação das alterações celulares induzidas pela naftopterocarpanoquinona LQB-118 em *Leishmania amazonensis***. 2011. 100 (Ms). Pós graduação em biologia celular e molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

RICE, K. C.; BAYLES, K. W. Death's toolbox: examining the molecular components of bacterial programmed cell death. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 729-738, 2003.

RICE, K. C.; BAYLES, K. W. Molecular control of bacterial death and lysis. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 72, n. 1, p. 85-109, Mar 2008.

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

ROHWER, F.; AZAM, F. Detection of DNA Damage in Prokaryotes by Terminal Deoxyribonucleotide Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 3, p. 1001-1006, 2000.

ROLAND, F.; ESTEVES, F. A. Dynamics of phosphorus, carbon and nitrogen in a Amazonian lake impacted by bauxita tailings (Lake Batata, Pará, Brazil). **Verh. int. Ver. Limnol.**, v. 25, p. 925-930, 1993.

ROLAND, F. et al. Relationships between pelagic bacteria and phytoplankton abundances in contrasting tropical freshwaters. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 60, n. 3, p. 261-272, 2010.

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

SANTHANA RAJ, L. et al. Mesosomes are a definite event in antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Tropical Biomedicine**, v. 24, n. 1, p. 105-109, 2007.

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

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

SCHUMANN, R. et al. Viability of bacteria from different aquatic habitats - II. Cellular fluorescent markers for membrane integrity and metabolic activity. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 32, p. 137-159, 2003.

SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, v. 7, n. 3, p. 253-266, 1973.

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.

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

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

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

SHOCKMAN, G. D. et al. Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. **Microbial Drug Resistance**, v. 2, n. 1, p. 98-95, 1996.

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

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

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

SIOLI, H. The Amazon: Limnology and landscape of a mighty tropical river and its basin. In: SIOLI, H. (Ed.). **The Amazon and its main affluents: Hydrigraphy, morphology of the river courses, and river types**. Dordrecht, 1984. p.127-165.

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

SMITH, T. J.; FOSTER, S. J. Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 13, p. 3855-3862, 1995.

SOARES, M. C. et al. Light Microscopy in Aquatic Ecology: Methods for Plankton Communities Studies. **Methods Mol Biol.**, v. 689, p. 215-227, 2011.

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

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

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

SUTER, E.; JUHL, A. R.; MULLAN, G. D. O. Particle Association of Enterococcus and Total bacteria in the Lower Hudson River Estuary, USA. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 3, n. 715-725, 2011.

SZABADKAI, G.; RIZZUTO, R. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? **FEBS Lett**, v. 567, n. 1, p. 111-5, 2004.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 231-41, 2008.

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

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

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The Unseen Majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

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

WYLLIE, A. H. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. **Mol Neurobiol**, v. 42, n. 1, p. 4-9, 2010.

YAMAGUCHI, Y.; PARK, J. H.; INOUE, M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. **Annu Rev Genet**, v. 45, p. 61-79, 2011.



YOUNG, R. Bacteriophage holins: deadly diversity. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 4, p. 21-36, 2002.

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

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, F. Morphological Features of Cell Death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.

ZWEIFEL, U. L.; HAGSTROM, A. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 6, p. 2180-2185, 1995.