

Juliana Guimarães Ferreira

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA
DE BACTÉRIA MAGNETOTÁTICA DE FONTE TERMAL
DO DESERTO DE MOJAVE**



Monografia apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JUNHO/2019**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Fernanda de Ávila Abreu.

FICHA CATALOGRÁFICA

F383c Ferreira, Juliana Guimarães
Caracterização Morfológica e Filogenética de
Bactéria Magnetotática de Fonte Termal do Deserto
de Mojave / Juliana Guimarães Ferreira. -- Rio de
Janeiro, 2019.
58 f.

Orientadora: Fernanda de Ávila Abreu.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. microbiologia ambiental. 2. Bactérias
magnetotáticas. 3. magnetotaxia. 4. magnetossomos.
5. filogenia. I. Abreu, Fernanda de Ávila, orient.
II. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Juliana Guimarães Ferreira**
 DRE: 116061502

BANCA EXAMINADORA: Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)
 Prof. Pedro Ernesto Lopes Leão
 MSc. Jackeline Rossetti Mateus
 Profa. Dirlei Nico (Suplente)

Título da Monografia: **“Caracterização morfológica e filogenética de bactéria magnetotática de fonte termal do deserto de Mojave”**

Local: Sala de Reunião do Departamento de Microbiologia Geral / CCS / UFRJ
 Data e hora de início: 28 de junho de 2019 às 09:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (c/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 28 de junho de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	<u>Ana Maria Mazotto de Almeida</u> Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida
<u>10,0</u>	<u>Pedro Ernesto Lopes Leão</u> Prof. Pedro Ernesto Lopes Leão
<u>10,0</u>	<u>Jackeline Rossetti Mateus</u> MSc. Jackeline Rossetti Mateus
_____	_____ Profa. Dirlei Nico
Aluno:	<u>Juliana Guimarães Ferreira</u> Juliana Guimarães Ferreira
Orientador:	<u>Fernanda de Ávila Abreu</u> Prof. Fernanda de Ávila Abreu
Coordenador de TCC	<u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

À memória do meu avô, Paulo Faria
Guimarães, a quem dedico todas as minhas
conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar, guiar e colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Ao CNPq e à FAPERJ por terem financiado esta pesquisa.

À UFRJ, pela locação, apoio técnico e por ter sido minha segunda casa durante estes quatro anos.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) e seus funcionários, pelas locações e apoio técnico. Aos professores do Instituto, pelos ensinamentos e apoio.

A todos os membros do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia (LaBMax), pelo apoio, auxílio e companheirismo, e à Unidade Multiusuário de Microscopia (UniMicro) e seus funcionários pelas locações e apoio técnico.

Aos meus pais, Adriano e Alessandra, pelo amor, apoio e carinho incondicional, sem os quais eu não teria chegado aonde cheguei. Obrigada por serem os melhores pais que eu poderia ter, por acreditarem e confiarem em mim, e por estarem comigo em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Adriana, Paula e Gabriel, pelo apoio, amor e cumplicidade. Obrigada por serem os meus melhores amigos, não poderia desejar melhores.

Aos meus familiares, por me acompanharem nesta jornada. Em especial aos meus avós Paulo, Edna, Fernando e Maria, e ao meu padrinho Paulo, que me apoiam desde sempre.

Ao meu noivo, Igor, pelo apoio, companheirismo, carinho e amor durante todos estes anos.

Aos meus amigos da faculdade, Larissa, Letícia, Victor, Matheus, Mariana e Beatriz, pelo apoio durante a Graduação, não seria o mesmo passar por ela sem vocês.

A minha orientadora, Fernanda Abreu, por ter me guiado e auxiliado durante a Graduação. Obrigada por ser essa grande fonte de inspiração como mulher, professora e pesquisadora. Obrigada pelo companheirismo e pelos ensinamentos durante estes anos e por me proporcionar experiências fantásticas no mundo da Ciência.

Ao meu orientador, Ulysses Lins, por ter me acolhido no grupo LaBMax e acreditado no meu potencial, quando eu estava apenas no primeiro período. Obrigada por todos ensinamentos, estes estarão sempre guardados no meu coração.

“Every action is an act of creation” – Lin-Manuel Miranda (2015)

RESUMO

JULIANA GUIMARÃES FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA DE BACTÉRIA MAGNETOTÁTICA DE FONTE TERMAL DO DESERTO DE MOJAVE

Orientadora: Fernanda de Ávila Abreu

Bactérias magnetotáticas (BMs) são um grupo de microrganismos aquáticos e flagelados, que possuem morfologia e metabolismo diverso, além de distribuídas em diferentes filios do domínio Bacteria. BMs possuem a capacidade de produzir magnetossomos, nanocristais ferromagnéticos envoltos por membrana biológica. Estes cristais conferem à bactéria a capacidade de se alinhar passivamente ao campo geomagnético, isto associado ao movimento flagelar compõe o fenômeno da magnetotaxia. Os magnetossomos são formados a partir de um processo de biomineralização e os principais genes relacionados são os genes *mam*. O objetivo deste trabalho é caracterizar morfológicamente e filogeneticamente uma nova espécie de bactéria magnetotática, encontrada em fontes termais no Deserto de Mojave, Nevada, EUA, pertencente ao filo *Nitrospirae*. Após o enriquecimento magnético, que permite a obtenção de amostra de bactérias magnetotáticas concentrada, foi possível observar a presença apenas de células ovoides que respondiam ao campo magnético aplicado por um ímã. A morfologia ovoide foi confirmada posteriormente através da análise de imagens. A observação das amostras por microscopia eletrônica de transmissão mostrou a presença de magnetossomos com formato ponta de lança de aproximadamente 102,5 nm organizados em múltiplas cadeias na célula. Através do enriquecimento magnético das amostras foi possível realizar a amplificação do genoma utilizando o kit REPLI-g e o sequenciamento do mesmo através da plataforma Illumina. A partir da anotação automática obtida através do servidor RAST do genoma montado utilizando o software CLC Genomics Workbench, foi possível identificar o gene que codifica o rRNA 16S, os genes relacionados à biomineralização e outros de relevância na caracterização do potencial metabólico da bactéria magnetotática em estudo. O genoma parcial montado possui 2.804.646 pb em 188 *contigs*, sendo que o maior *contig* possui 145 kb. A análise por BLASTn do gene que codifica o rRNA 16S mostrou que essas células pertencem ao filo *Nitrospirae*, sendo próxima à *Candidatus* Magnetovum chiemensis cepa CS-4 (91% de similaridade entre as sequências). Foi feita uma análise de homologia utilizando as sequências codificadas pelos genes *mam* conhecidas, com a finalidade de identificar esse grupo de genes na célula ovoide estudada, sendo estes: *mamA*, *mamB*, *mamC*, *mamE*, *mamI*, *mamK*, *mamM*, *mamP*, *mamQ-I* e *mamQ-II*. Também foram feitas árvores filogenéticas (com base no gene que codifica o rRNA 16S e com base nas proteínas Mam), utilizando o programa MEGA, e análise por homologia de enzimas chave de vias metabólicas da bactéria. Foram encontrados genes que codificam enzimas chave de vias metabólicas que sugerem que célula magnetotática ovoide é capaz de fixar nitrogênio (genes *nif*) e carbono (gene para a enzima RubisCO), bem como crescimento anaeróbico através da respiração de sulfato, o que é interessante para a elaboração de um meio de cultivo e para entender o seu comportamento e sua função no ambiente e nos ciclos biogeoquímicos. Em vista dos dados morfológicos e genéticos obtidos propõe-se o nome *Candidatus* Magnetovoide thermalis cepa GS-1 para essa espécie.

Palavras-chave: bactérias magnetotáticas, magnetossomos, magnetotaxia, filogenia, bioinformática

ABSTRACT

JULIANA GUIMARÃES FERREIRA

MORPHOLOGIC AND PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION OF MAGNETOTACTIC BACTERIA FROM MOJAVE DESERT'S HOT SPRINGS

Advisor: Fernanda de Ávila Abreu

Magnetotactic bacteria (MTB) comprise a group of aquatic and flagellated microorganisms that are morphologically and metabolically diverse besides being dispersed in different phyla in Bacteria domain. MTB are able to produce magnetosomes, that are ferromagnetic nanocrystals surrounded by biological membrane. These crystals give the bacteria the ability of aligning themselves along the Earth's magnetic field. This ability associated to flagella movement is called magnetotaxis. Magnetosomes are produced by a process called biomineralization and the principal genes involved are the *mam* genes. The objective of this work is characterizing morphologically and phylogenetically a new MTB species from the *Nitrospirae* phylum found in Mojave Desert's hot springs, Nevada, EUA. After magnetic enrichment, method that allows us to obtain MTB samples concentrated, we could see ovoid cells responding to a magnetic field applied by a magnet. Cells' morphology was confirmed after image analysis. The observation of the samples by transmission electron microscopy showed the presence of bullet-shaped magnetosomes of approximately 102.5 nm arranged in multiple chains inside the cell. Through magnetic enrichment, it was possible to amplify the genome using the REPLI-g kit and the its sequencing using Illumina platform. From the automatic annotation obtained through the RAST server of the genome assembled using the CLC Genomics Workbench software, it was possible to identify the gene encoding the 16S rRNA, the genes related to biomineralization and others of relevance in the characterization of the metabolic potential of the MTB under study. Partial genome has 2,804,646 bp in 188 contigs, the largest contig has 145 kb. BLASTn analysis of 16S rRNA gene has shown that these cells belong to the phylum *Nitrospirae*, being close to *Candidatus Magnetovum chiemensis* strain CS-4 (91% similarity between the sequences). A homology analysis was performed using the sequences encoded by known *mam* genes, with the purpose of identifying this group of genes in the ovoid cell studied: *mamA*, *mamB*, *mamC*, *mamE*, *mamI*, *mamK*, *mamM*, *mamP*, *mamQ-I* and *mamQ-II*. Phylogenetic trees (based on the gene 16S rRNA gene and based on the Mam proteins) were done using MEGA program, and also homology analysis of key metabolic pathway enzymes from the bacterium. We have found genes encoding key metabolic pathway enzymes that suggest that this species is able to fixate nitrogen (*nif*) and carbon (RubisCO encoding gene), as well as anaerobic growth through sulfate respiration, which is interesting for the elaboration of a culture medium and to understand its behavior and its function in the environment and in biogeochemical cycles. In view of the morphological and genetic data obtained we propose the name *Candidatus Magnetovoide thermalis* strain GS-1 for this species.

Keywords: Magnetotactic bacteria, magnetosomes, magnetotaxis, phylogeny, bioinformatics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool Between Nucleotides
BLASTp	Basic Local Alignment Search Tool Between Proteins
BM	Bactéria Magnetotática
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDS	Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios-X
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
IOA	Interface óxica-anóxica
MAI	Ilha do Magnetossomo
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEVT	Microscopia Eletrônica de Varredura por Transmissão
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RAST	Rapid Annotations Using Subsystems Technology
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
tRNA	RNA transportador
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão de diferentes morfologias de bactérias magnetotáticas.	1
Figura 2. Ilustração representativa da magnetotaxia.	2
Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando as diferentes morfologias do magnetossomo.	5
Figura 4. Ilustração resumindo as aplicações conhecidas do magnetossomo (separação de células, hipertermia, contraste de imagem, imobilização de enzimas e biorremediação, análise DNA/Antígeno, análise de alimentos e drug delivery).	7
Figura 5. Árvore filogenética baseada no alinhamento concatenado de mais de 400 proteínas conservadas, mostrando a distribuição filogenética de bactérias magnetotáticas.	8
Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da bactéria magnetotática <i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1, pertencente a classe Alphaproteobacteria.	9
Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de diferentes cepas de <i>Magnetospirillum</i> spp. de amostra ambiental.	9
Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de bactéria magnetotática pertencente a classe Betaproteobacteria.	10
Figura 9. Imagens de um agregado multicelular pertencente à espécie <i>Ca. Magnetoglobus multicellularis</i> obtidas por diferentes técnicas de microscopia.	11
Figura 10. Microscopias de representantes do filo <i>Nitrospirae</i>	16
Figura 11. Imagens da bactéria em estudo obtidas por diferentes técnicas de microscopia.	22
Figura 12. Gráficos de distribuição de diâmetro e fator de forma obtidos a partir da medida do diâmetro de células em imagens de microscopia óptica por contraste interferencial diferencial (n = 199).	23
Figura 13. Gráficos de distribuição de comprimento, largura e fator de forma dos magnetossomos, obtidos a partir da medida dos cristais em imagens de microscopia eletrônica de transmissão (n = 17).	23
Figura 14. Árvore filogenética baseada no gene que codifica o rRNA 16S utilizando o método de máxima verossimilhança.	25
Figura 15. Árvores filogenéticas baseadas nas sequências de proteínas MamA (A) e MamB (B), nas quais foi utilizado o método de máxima verossimilhança.	28
Figura 16. Árvores filogenéticas baseadas nas sequências de proteínas MamE (A) e MamK (B), nas quais foi utilizado o método de máxima verossimilhança.	29
Figura 17. Árvores filogenéticas baseadas nas sequências de proteínas MamP (A) e MamQ (B), nas quais foi utilizado o método de máxima verossimilhança.	30
Figura 18. Ilustração indicando a organização dos genes mam de representantes do filo <i>Nitrospirae</i> , sendo estes <i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> cepa HCH-1, <i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i> , <i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> cepa CS-04 e a espécie em estudo.	31
Figura 19. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de magnetossomos de magnetita e greigita.	36
Figura 20. Ilustração resumindo as relações filogenéticas da espécie em estudo com outras bactérias magnetotáticas dos filios <i>Nitrospirae</i> e <i>Proteobacteria</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados sobre os genomas de bactérias magnetotáticas que estão disponíveis, sejam parciais ou não, de cepas cultivadas ou não.	12
Tabela 2. Vias metabólicas importantes a serem analisadas e suas respectivas enzimas.....	19
Tabela 3. Dados gerais obtidos a partir do sequenciamento e montagem do genoma da bactéria magnetotática estudada.	24
Tabela 4. Tabela relacionando os best hits da análise de homologia para sequências de proteínas codificadas pelos genes de biomineralização conservados por BLASTp.....	26
Tabela 5. Resultados da análise por homologia por melhor hit bi-direcional de genes que codificam enzimas chave de vias metabólicas importantes.....	32
Tabela 6. Tabela sintetizando informações sobre a morfologia de espécies pertencentes ao filo <i>Nitrospirae</i> já descritos na literatura.	34

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Bactérias magnetotáticas	1
1.2. Características gerais dos magnetossomos	4
1.3. Diversidade e genomas de bactérias magnetotáticas	7
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivos gerais	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. METODOLOGIA.....	17
4.1. Coleta das amostras	17
4.2. Microscopia óptica	18
4.3. Microscopia eletrônica de transmissão.....	18
4.4. Amplificação, sequenciamento e montagem do genoma	19
4.5. Anotação do genoma	19
4.7. Análise filogenética	21
5. RESULTADOS	21
5.2. Análise do genoma	24
5.3. Filogenia baseada no gene que codifica o rRNA 16S	24
7. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO.....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bactérias magnetotáticas

Em 1951, Salvatore Bellini observou que algumas bactérias se acumulavam na borda da gota de uma amostra de sedimento, tendo seu nado alterado possivelmente pelo campo magnético ao colocar um ímã próximo ao microscópio (Bellini, 1963). No entanto, foi apenas em 1975 que Richard Blakemore oficialmente descreveu as bactérias magnetotáticas como células contendo inclusões ricas em ferro, sendo estas denominadas magnetossomos (Blakemore, 1975).

As bactérias magnetotáticas são procariotos Gram-negativos, aquáticos, flagelados, metabolicamente e morfologicamente variados (Figura 1), e dispersos em filios do domínio Bacteria. Este grupo possui a capacidade de produzir nanocristais ferromagnéticos compostos por magnetita (Fe_3O_4) ou greigita (Fe_3S_4), envoltos por membrana biológica. Estas estruturas são chamadas de magnetossomos.

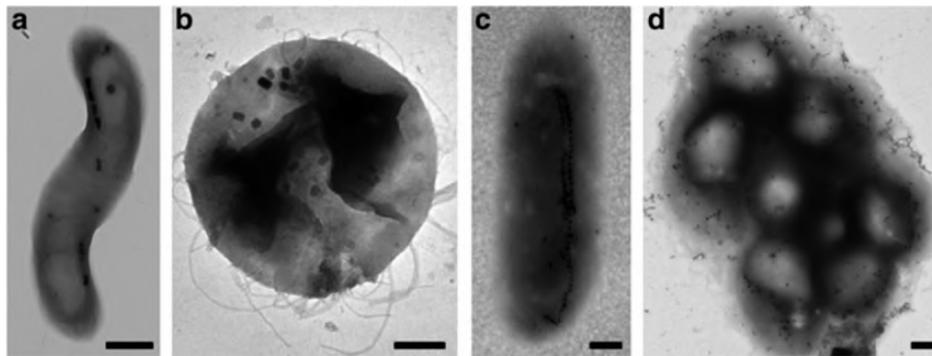


Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de diferentes morfologias de bactérias magnetotáticas. **A.** Espirilo. **B.** Coco. **C.** Bastonete. **D.** Forma multicelular. Os magnetossomos são as estruturas elétron-densas no interior das células. A barra de escala indica 200 nm em todas as imagens. Figura retirada de Lefèvre *et al.* (2011e).

A biomineralização é um processo pelo qual tanto procariotos quanto eucariotos produzem minerais, com diferentes formas, organizações, tamanhos e composições (Wang e Nielsen-Hamilton, 2013). Os seres eucariontes, como corais e musgos, são conhecidos por produzirem estruturas mineralizadas complexas, enquanto os procariotos são conhecidos por sua variedade e complexidade de reações metabólicas que resultam em uma grande diversidade de minerais produzidos, sendo de importância inegável para os ciclos biogeoquímicos (Gilbert, Abrecht e Frazer, 2005; Gadd, 2010).

A característica que define as bactérias magnetotáticas é a produção de magnetossomos (Balkwill *et al.*, 1980), como mencionado anteriormente. Estes nanocristais

ferromagnéticos estão, geralmente, organizados em cadeia, proporcionando à bactéria a capacidade de se alinhar passivamente ao campo geomagnético (Figura 2). Esta propriedade somada ao movimento flagelar é o fenômeno denominado de magnetotaxia (Blakemore, 1982). Quase todas as bactérias magnetotáticas organizam seus magnetossomos em uma ou mais cadeias dentro da célula, maximizando o momento de dipolo magnético da célula (Bazylinski e Frankel, 2004). Isso confere às bactérias magnetotáticas uma vantagem evolutiva, visto que elas fazem uma busca unidimensional pelo melhor habitat para sobrevivência/crescimento, já que são orientadas pela linha do campo magnético da Terra, ao contrário das bactérias não-magnetotáticas que precisam fazer uma busca tridimensional pelo ambiente ótimo para sobreviver. As bactérias magnetotáticas podem ser classificadas em duas polaridades magnéticas diferentes, podendo ser do tipo Sul ou do tipo Norte (Blakemore, Frankel e Kalmijn, 1980; Kirschvink, 1980). As polaridades se diferenciam pela orientação do dipolo magnético gerado pela(s) cadeia(s) de magnetossomos em relação ao flagelo da bactéria (Frankel e Blakemore, 1980). As células de tipo Sul têm a polaridade Sul da cadeia de magnetossomos mais próxima da parte oposta ao flagelo da bactéria, ao contrário das bactérias magnetotáticas de tipo Norte, que têm o Norte do dipolo magnético na porção contrária ao flagelo da bactéria (Torres De Araújo *et al.*, 1990). Assim, bactérias magnetotáticas encontradas no Hemisfério Sul nadam antiparalelamente ao campo magnético, enquanto as encontradas no Hemisfério Norte nadam paralelamente ao campo magnético (Figura 2).

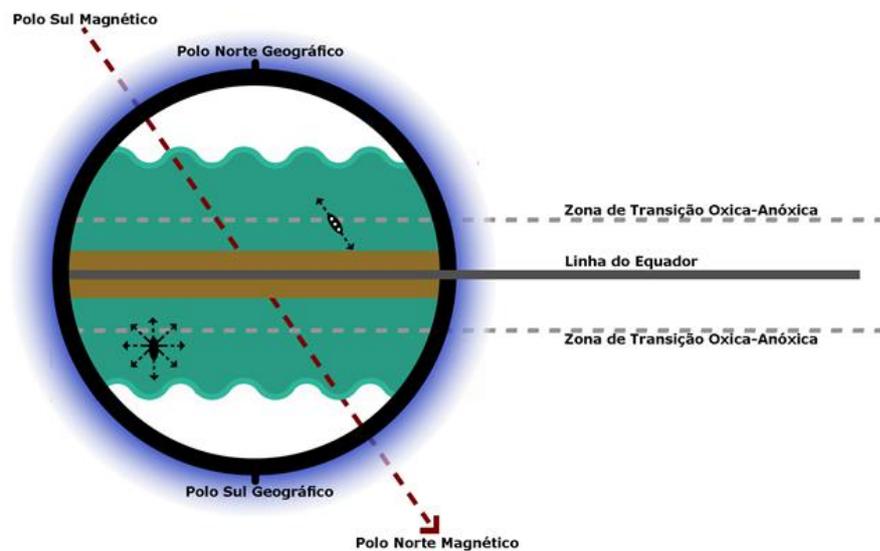


Figura 2. Ilustração representativa da magnetotaxia. O esquema indica o comportamento das bactérias magnetotáticas (representadas pela célula com os pontos brancos no interior

(representando os magnetossomos) ao longo do campo magnético da Terra, em que a célula nada alinhada ao campo geomagnético. Assim, a bactéria nada em direção ao Norte ou Sul magnético, ao contrário de bactérias não-magnetotáticas (representadas pela célula preta lista). Figura retirada de Leão (2018).

As bactérias magnetotáticas são procariotos aquáticos, existentes em ambientes de água doce ou salgada. São comuns em sedimentos e colunas d'água estratificadas quimicamente de ambientes de água doce, salobros, marinhos e hipersalinos com pH próximo de neutro (Moench e Konetzka, 1978; Blakemore, 1982; Bazylinski *et al.*, 1995), tendo sido descritas, também, bactérias magnetotáticas em ambientes profundos (Petermann e Bleil, 1993). As bactérias magnetotáticas são um grupo em maioria microaerófilo, vivendo na interface óxica-anóxica (IOA) da coluna d'água, porém as bactérias produtoras de greigita já descritas são anaeróbias estritas e são encontradas geralmente abaixo da IOA (Bazylinski *et al.*, 1995). A maioria das bactérias magnetotáticas vive em pH próximo ao neutro e temperaturas amenas (22°-28°C), porém já foram descritas bactérias magnetotáticas extremófilas, como diversas cepas alcalifílicas isoladas de diversos pontos da Califórnia com crescimento ótimo em pH > 9,0 (Lefèvre *et al.*, 2011a) e *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*, um microrganismo magnetotático de forma multicelular que vive em ambiente hipersalino (Abreu *et al.*, 2007).

Em relação a temperatura já foi relatada uma bactéria magnetotática moderadamente termófila, com temperatura de crescimento em até 63 °C (Lefèvre *et al.*, 2010), e também cocos magnetotáticos que vivem abaixo dos 4 °C na Antártica (Abreu *et al.*, 2016). Além disso, a salinidade também é um fator descrito como fundamental na localização de populações específicas de bactérias magnetotáticas (Spring *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2012).

Apesar da grande diversidade metabólica, que é um desafio no cultivo de novas espécies de bactérias magnetotáticas, algumas espécies de bactérias magnetotáticas que foram isoladas tiveram seu genoma sequenciado, descrevendo detalhes da biomineralização em nível molecular. Devido à possibilidade de recuperar bactérias magnetotáticas não cultivadas de amostras ambientais utilizando campo magnético externo (ímã), o genoma dessas espécies foi estudado e permitiu análise das características genéticas associadas à biomineralização (Lefèvre & Wu, 2013). Espécies de bactérias magnetotáticas foram descritas como afiliadas a diferentes filos do domínio Bacteria. Atualmente, é descrita a presença de bactérias magnetotáticas nas classes Alpha-, Beta- (Abreu *et al.*, 2018), Gamma-, Delta- e *Ca.* Eta-,do

filo *Proteobacteria*, no filo *Nitrospirae*, no filo *Omnitrophica*, também já sendo descritos genomas de bactérias magnetotáticas nas classes *Ca. Lambda-* e *Zeta-* do filo *Proteobacteria* e nos filios *Planctomycetes* e *Latescibacteria* (Lin *et al.*, 2018).

Independentemente da posição filogenética das bactérias magnetotáticas, a produção de magnetossomos é intimamente ligada à expressão dos genes *mam*, que são exclusivos de bactérias magnetotáticas. Estes genes estão organizados em *clusters* no genoma, na maioria dos casos descritos, sendo essa região conhecida como ilha do magnetossomo (MAI – *Magnetosome Island*, do inglês; Schübe *et al.*, 2003). O cluster mais importante é o *mamAB*, conservado entre diferentes espécies de bactérias magnetotáticas, que codifica para proteínas diretamente envolvidas na formação do magnetossomo (Grünberg *et al.*, 2001). Além disso, o *cluster mamAB* possui também genes adicionais que não são homólogos a qualquer outro gene de bactérias não-magnetotáticas, sugerindo um papel especial na biomineralização (Grünberg *et al.*, 2001). Estes genes podem ser divididos em 6 diferentes classes de homologia: além de duas classes desconhecidas, (i) proteínas TPR, (ii) transportadores CDF, (iii) proteases serina HTrA-like, e (iv) proteínas LemA-like (Murat *et al.*, 2010). Atualmente, os genomas de bactérias magnetotáticas estão sendo estudados com o propósito de descrever e caracterizar a biomineralização e seus principais processos e componentes, além de fornecer informações para a compreensão dos eventos evolutivos que indiquem como estes genes estão distribuídos no grupo dos procariotos.

1.2. Características gerais dos magnetossomos

A primeira descrição dos magnetossomos aconteceu em 1975 por Richard Blakemore, na qual o pesquisador relatou a observação de “cadeias de partículas ricas em ferro” (Blakemore, 1975). O magnetossomo é uma organela produzida especificamente por organismos magnetotáticos, formados por nanocristais ferromagnéticos envoltos por bicamada lipídica (Gorby *et al.*, 1988), podendo ser de magnetita (Fe_3O_4) (Frankel, Blakemore e Wolfe, 1979) ou greigita (Fe_3S_4) (Mann *et al.*, 1990). As bactérias magnetotáticas, em sua maioria, possuem em média de 10 a 20 magnetossomos e os tamanhos dos cristais variam de 35 a 120 nm em média (Lower e Bazylinski, 2013).

A morfologia do magnetossomo se enquadra em três grupos: (i) cubo-octaédrico, (ii) prismático ou pseudo-hexagonal alongado e anisotrópico ou ponta de lança (Figura 3). O

número de cristais e cadeias, assim como a sua composição e morfologia, varia de espécie para espécie, porém são espécie-específicas, ou seja, bactérias da mesma espécie produzem magnetossomos com a mesma composição e morfologia (Bazylinski e Frankel, 2004).

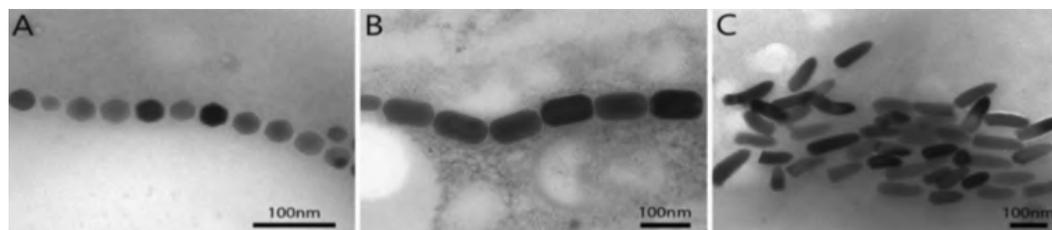


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando as diferentes morfologias do magnetossomo. **A.** Cubo-octaédrico. **B.** Prismático. **C.** Ponta-de-lança. A barra de escala indica 100 nm em todas as figuras. Imagem retirada de Vargas *et al.* (2018).

As etapas de produção dos magnetossomos são orquestradas por uma série de genes que geram uma maquinaria extremamente complexa. A biomineralização de magnetossomos envolve mais de 40 genes que codificam enzimas associadas a produção destes cristais. Os genes *mam*, citados anteriormente como genes de biomineralização, codificam proteínas de membrana, como transportadores, que vão ser importantes para a importação de ferro e outras moléculas para dentro do espaço circundado pela bicamada lipídica onde será produzido o magnetossomo. Além disso, muitos destes genes são conservados entre espécies (Grünberg, 2001), o que funciona como marcadores filogenéticos.

A formação dos magnetossomos de greigita é pouco conhecida, ao contrário da de magnetita, que é mais bem descrita. Os magnetossomos de magnetita são formados a partir do transporte de ferro extracelular (férrico ou ferroso) para o interior da célula e sua formação é dividida em quatro etapas. No periplasma, começa a etapa de nucleação do cristal de magnetita a partir da invaginação da membrana citoplasmática, sendo MamB uma proteína indispensável para esta fase (Uebe e Schüler, 2016). Além disso, sabe-se que o *operon mamLQBIEMO* possui um papel importante na formação da membrana do magnetossomo, já com a deleção deste *operon*, gerou diversas anomalias na invaginação da membrana (Murat *et al.*, 2010; Raschdorf *et al.*, 2016). MamA (Yamamoto *et al.*, 2010; Zeytuni *et al.*, 2011) exerce o papel de recrutamento de proteínas, facilitando a interação entre estas, como por exemplo Mms6, para ativar a produção de magnetita. A etapa seguinte de produção dos magnetossomos é o transporte de ferro, um processo no qual uma grande quantidade de ferro é acumulada na área interna da membrana do magnetossomo. Além do ferro extracelular, pode ser usado o ferro intracelular como forma alternativa de formação dos cristais (Komeili,

2012). Nesta etapa do processo existem três diferentes rotas possíveis para a formação do cristal. A primeira considera que o ferro adentra o lúmen da vesícula do magnetossomo enquanto a membrana intracelular ainda está em contato com a membrana citoplasmática da célula através de transporte ou difusão vinda do periplasma (Rahn-Lee e Komeili, 2013). A segunda rota possível é o uso de sistemas de transporte de ferro comuns, em seguida, transportadores específicos presentes na membrana do magnetossomo fariam o transporte para o lúmen da vesícula (Frankel *et al.*, 1983; Uebe *et al.*, 2011; Rarschdorf *et al.*, 2013). Na última rota proposta, o ferro seria transportado diretamente da membrana citoplasmática para a membrana do magnetossomo através de ligações com substratos orgânicos ainda desconhecidos, que seriam liberados pela membrana citoplasmática na interface membrana citoplasmática-membrana do magnetossomo, permitindo que a biomineralização ocorra sem o transporte de ferro do citoplasma (Faivre e Schüller, 2008). A etapa seguinte é o controle redox da biomineralização de magnetita, seguida da nucleação. O processo de nucleação envolve $\text{pH} > 7$ e baixo potencial redox. É a etapa em que o ferro começa a adquirir forma. (Uebe e Schüller, 2016). Após a nucleação, proteínas específicas de biomineralização, como por exemplo, Mms48 e MamN, atuam na regulação da forma e tamanho do magnetossomo. Em seguida, os magnetossomos são alinhados em uma ou mais cadeias seguindo um filamento de proteína homóloga à actina, formado pela proteína MamK, que são ligados à membrana do magnetossomo pela proteína MamJ, finalizando a biomineralização (Bazylnski e Frankel, 2004).

Os magnetossomos têm diversas aplicações biotecnológicas em áreas como Medicina, Biomedicina e na indústria (Vargas *et al.*, 2018) (Figura 4). Magnetossomos são envoltos por membrana biológica tornando-os estruturas biocompatíveis. Além disso, a membrana biológica tem a capacidade de ancorar diversas moléculas, como proteínas, polímeros, medicamentos e entre outros. Algumas abordagens biotecnológicas vêm sendo desenvolvidas com magnetossomos, como imobilização de enzimas para aplicação em biorremediação (Shimoshige *et al.*, 2017), hipertermia magnética (Chen *et al.*, 2016), *drug delivery* (Martel, 2017), entre outros (Figura 4).

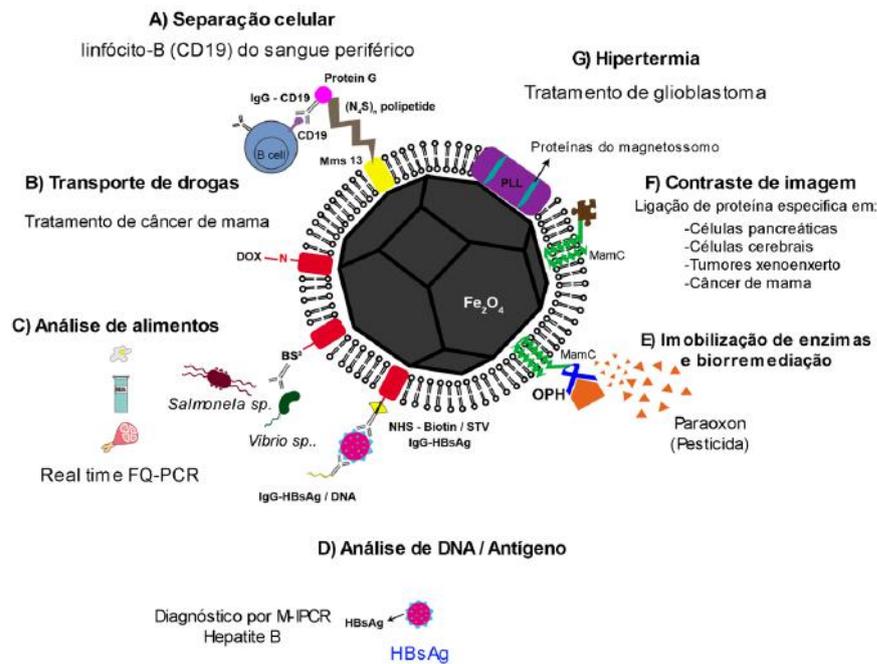


Figura 4. Ilustração resumindo as aplicações conhecidas do magnetossomo (separação de células, hipertermia, contraste de imagem, imobilização de enzimas e biorremediação, análise DNA/Antígeno, análise de alimentos e *drug delivery*). Separação de células: por exemplo, para separar linfócitos B (CD19+) do sangue periférico. Hipertermia magnética: magnetossomos associados à Poli-L-Lisina (PLL) para hipertermia no tratamento de doenças, como glioblastoma. Contraste de imagem: magnetossomos com proteínas específicas ligadas à superfície com alta afinidade às células alvo. Imobilização de enzimas e biorremediação: MamC sendo exposta na membrana e fundida com organofosfohidrolase (OPD) para a degradação de paraoxon. Análise DNA/Antígeno: diagnóstico de Hepatite B por M-IPCR, em que o magnetossomo funcionalizado com anticorpo é utilizado para imobilizar HBsAg. Análise de alimentos: as proteínas do magnetossomo podem ser utilizadas em um sistema de detecção de espécies de *Salmonella* e *Vibrio*. *Drug delivery*: Associação de proteínas da superfície do magnetossomo com drogas para fins médicos, como, por exemplo, dextrorubina para tratamento de câncer de mama. Imagem adaptada de Vargas *et al.* (2018).

1.3. Diversidade e genomas de bactérias magnetotáticas

Como mencionado anteriormente, até o momento foram descritas bactérias magnetotáticas dos filos *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Omnitrophica*, *Planctomycetes* e *Latescibacteria* (Figura 5). Em alguns casos não existe informação morfológica sobre a bactéria magnetotática ou o tipo de magnetossomo produzido, como são os casos dos representantes descrito nos filos *Latescibacteria* (Lin e Pan, 2015), *Planctomycetes* (Lin, Pan e Bazylisnki, 2017) e nas classes *Ca. Eta*, *Ca. Lambda*- e *Zetaproteobacteria* do filo *Proteobacteria* (Lin *et al.*, 2018).

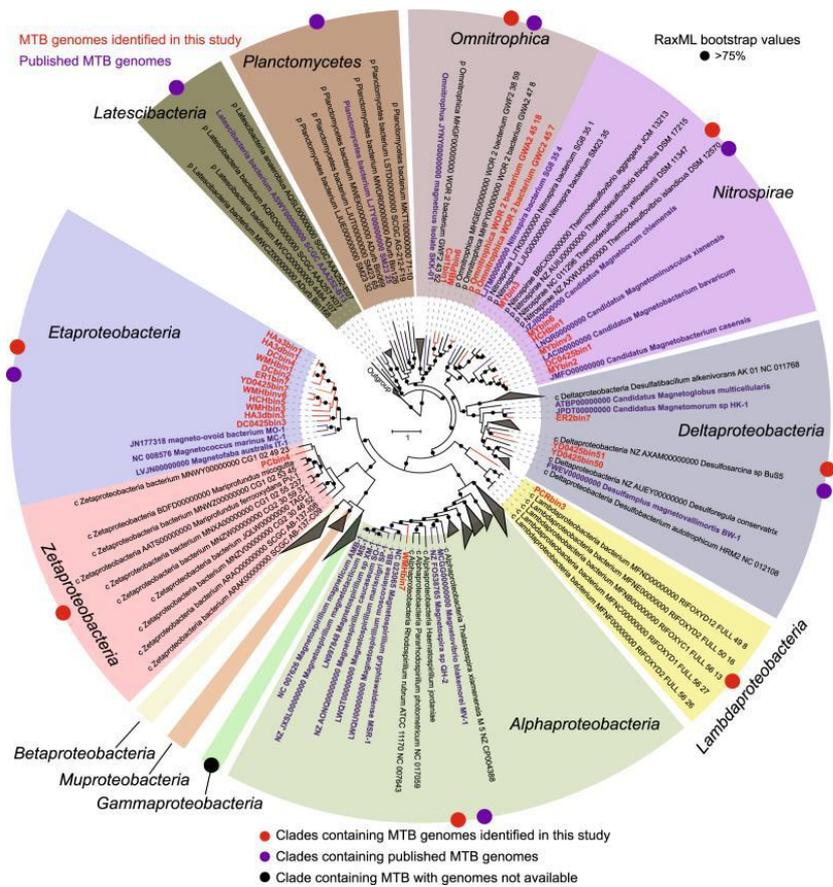


Figura 5. Árvore filogenética baseada no alinhamento concatenado de mais de 400 proteínas conservadas, mostrando a distribuição filogenética de bactérias magnetotáticas. Imagem retirada de Lin *et al.* (2018).

As bactérias magnetotáticas do filo *Proteobacteria* (Bazylnski e Frankel, 2004) formam o grupo com o maior número de representantes formalmente descritos. A morfologia de bactéria magnetotática mais encontrada no ambiente é coco, que antes se enquadrava na classe Alphaproteobacteria, mas Lin e colaboradores (2018) propuseram agrupar esta morfologia na classe Etaproteobacteria (Figura 5). A maioria dos cocos magnetotáticos cultivados pertencem a ordem Magnetococcales, tendo como membros *Magnetofaba australis* cepa IT-1 (Morillo *et al.*, 2014) (Figura 6), *Ca. Magnetococcus massalia* cepa MO-1 (Lefèvre *et al.*, 2009) e *Magnetococcus marinus* cepa MC-1 (Bazylnski *et al.*, 2013).

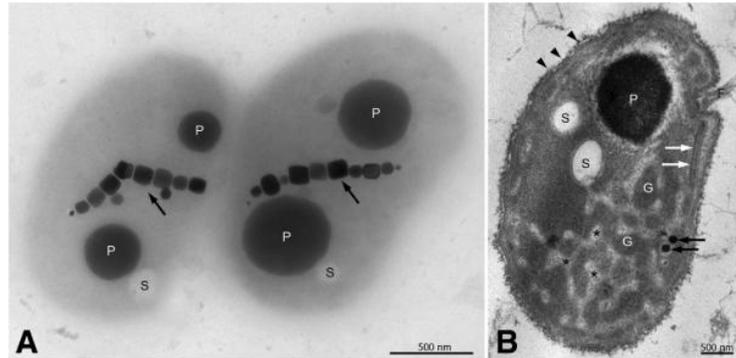


Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) da bactéria magnetotática *Magnetofaba australis* cepa IT-1, pertencente a classe Alphaproteobacteria. **A.** MET, onde setas indicam a cadeia de magnetossomos. Barra de escala indica 500 nm. (P) indica os grânulos ricos em fósforo e (S) indicam os grânulos ricos em enxofre. **B.** Corte ultrafino de *Magnetofaba australis* cepa IT-1. Setas pretas indicam magnetossomos, cabeça de setas pretas indicam a presença de uma membrana fibrilar na superfície da célula, setas brancas indicam arranjo de quimiorreceptores, S indica grânulos ricos em enxofre, (G) indica grânulos arredondados não-caracterizados. Asteriscos indicam material elétron-lucente. Barra de escala de 500 nm. Imagem retirada de Araújo *et al.* (2016).

Ainda na classe Alphaproteobacteria, existe a ordem Rhodospirillales, que abrange os espiros magnetotáticos encontrados em água doce. Os representantes desta ordem pertencem ao gênero *Magnetospirillum* (Greene e Komeili, 2012) (Figura 7), sendo estes *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1, *Ms. magneticum* cepa AMB-1, *Ms. magnetotaticum* cepa MS-1 (Williams *et al.*, 2012), *Ms. aberrantes* (Gorlenko *et al.*, 2011), *Ms. marisnigri*, *Ms. moscoviense* e *Ms. caucaseum* (Grouzdev *et al.*, 2014; Dziuba *et al.*, 2016).

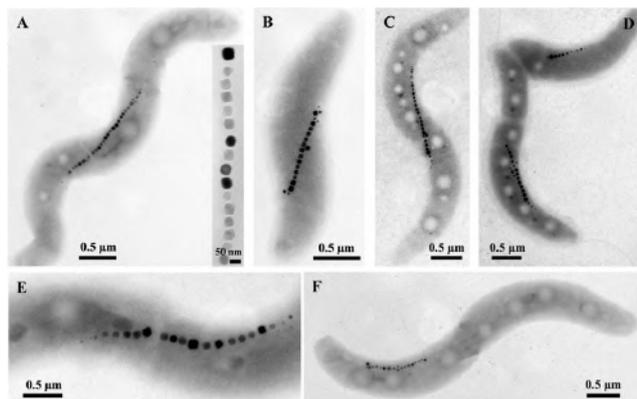


Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de diferentes cepas de *Magnetospirillum* spp. de amostra ambiental. **A.** Cepa CB-1. O inset mostra a cadeia de magnetossomos em maior magnificação. **B.** Cepa SS-4. **C.** Cepa LM-4. **D.** Cepa LM-5. Contrastada com Acetato de Uranila (1%). **E.** Cepa KR-1. **F.** Cepa NML-1. A barra de escala indica 0.5 μm nas imagens e 50 nm no inset em (A). Imagem retirada de Lefèvre *et al.* (2012).

Também são membros da classe Alphaproteobacteria *Magnetospira thiophila* cepa MMS-1 (Williams *et al.*, 2012), *Magnetospira* sp. cepa QH-2 (Zhu *et al.*, 2010). Até hoje, todas as bactérias magnetotáticas conhecidas que pertencem a classe Alphaproteobacteria produzem magnetossomos de magnetita.

Só é conhecida uma bactéria magnetotática pertencente a classe Betaproteobacteria (Abreu *et al.*, 2018) (Figura 8). A bactéria foi encontrada na Lagoa Comprida, uma lagoa ácida do Rio de Janeiro Brasil (pH ~ 4,4) e produz magnetossomos prismáticos alongados de magnetita. A bactéria pertence ao gênero *Hebaspirillum* e é referida em Abreu *et al.* (2018) como cepa CLV-1.

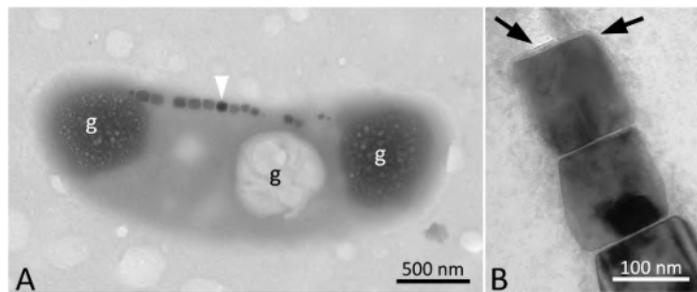


Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de bactéria magnetotática pertencente a classe Betaproteobacteria. **A.** Imagem obtida por MET. (g) indica a presença de grânulos no interior da célula. Cabeça de seta branca indica a cadeia de magnetossomos. **B.** Alta magnificação de uma imagem de MET mostrando os magnetossomos. Setas pretas indicam a membrana biológica que envolve o cristal. A barra de escala é 500 nm em (A) e 100 nm em (B). Imagem retirada de Abreu *et al.* (2018).

Em relação a classe Deltaproteobacteria, existem poucas espécies cultivadas, sendo elas anaeróbias e redutoras de sulfato (Lefèvre *et al.*, 2011a). Na ordem Desulfovibrionales há o representante *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1 (Sakagushi *et al.*, 2002). *Desulfamplus magnetovallimortis* cepa BW-1 e a cepa SS-1 são bactérias magnetotáticas cultivadas pertencentes a ordem Desulfobacterales, sendo a cepa BW-1 a única cepa cultivada que produz magnetossomos de greigita (Descamps *et al.*, 2017). Os procariotos multicelulares magnetotáticos (MMPs) também pertencem a ordem Desulfobacterales e formam um agregado multicelular de bactérias geneticamente idênticas, que se movimentam como uma única célula (Lins e Farina, 1999; Keim *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2007) (Figura 9). Estes microrganismos ainda não foram isolados em cultura pura e os dados disponíveis destas espécies são moleculares e ultraestruturais. São representantes de MMPs, *Ca. Magnetomorum litorale* (Wenter *et al.*, 2009), *Ca. Magnetoglobus multicellularis* (Abreu *et al.*, 2007), *Ca.*

Magnetanas rongchenensis (Chen *et al.*, 2015), *Ca. Magnetanas tsingtaoensis* (Zhou *et al.*, 2012), *Ca. Magnetanas drummondensis* (Chen *et al.*, 2016).

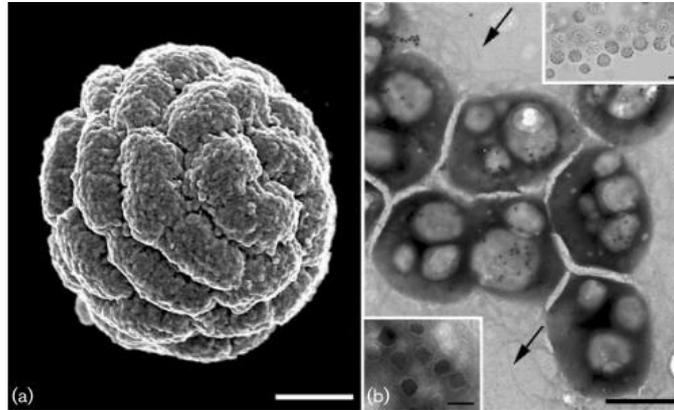


Figura 9. Imagens de um agregado multicelular pertencente à espécie *Ca. Magnetoglobus multicellularis* obtidas por diferentes técnicas de microscopia. **A.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando o exterior da célula. **B.** Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de luz. Setas indicam flagelos. A barra de escala indica 2 μm em **(A)**, 1 μm em **(B)**, 10 μm no inset da direita e 100 nm no inset da esquerda. Imagem retirada de Abreu *et al.* (2007).

Existem poucos representantes descritos na classe Gammaproteobacteria, sendo as cepas BW-2 e SS-5 isoladas em cultura pura (Lefèvre *et al.*, 2013a) outras 3 cepas descritas por metodologias independentes de cultivo na China (Wang *et al.*, 2013).

Ainda não foi descrita a morfologia, nem a ultraestrutura da bactéria magnetotática pertencente aos filos *Planctomycetes*, *Latescibacteria* e às classes Eta- e Zetaproteobacteria. Apenas foram encontrados os genes de magnetotaxia nas análises de metagenômica (Rinke *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2018).

O estudo do genoma de diferentes espécies de bactérias magnetotáticas mostrou que são geralmente compostos por um único cromossomo circular, com presença de plasmídeo detectada até o momento apenas nas espécies *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1 (Wang *et al.*, 2014), *Magnetospirillum magneticum* cepas AMB-1 e MGT-1 e *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1 (Sakagushi, Arakaki e Matsunaga, 2002) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados sobre os genomas de bactérias magnetotáticas que estão disponíveis, sejam parciais ou não, de cepas cultivadas ou não.

	Bactéria	Número de Acesso	Status	Tamanho do Genoma (bp)	Plasmídeo	Conteúdo GC	Referência
Alphaproteobacteria	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> cepa MSR-1*	HG794546	Completo	4,365,796	-	63.28	Wang <i>et al.</i> , 2014
	<i>Magnetospirillum magneticum</i> cepa AMB-1*	AP007255	Completo	4,967,148	-	65.09	Matsunaga <i>et al.</i> , 2005
	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> cepa MS-1	JXSL00000000	Parcial 36 contigs	4,523,935	-	63.6	Smalley <i>et al.</i> , 2015
	<i>Magnetospirillum caucaseum</i> cepa SO-1	AONQ01000000	Parcial 261 contigs	4,874,064	-	65.98	Grouzdev <i>et al.</i> , 2014
	<i>Magnetospirillum sp.</i> cepa XM-1	PRJEB11958	Completo	4,825,187	1 (167,290 bp)	65.6 (chr) 66.5 (plsm)	Não publicado
	<i>Magnetococcus marinus</i> cepa MC-1*	CP000471	Completo	4,719,581	-	54.17	Schübbe <i>et al.</i> , 2009
	<i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1*	KF933436	Parcial mam genes contig	72,493	-	57.6	Morillo <i>et al.</i> , 2014
	<i>Magnetovibrio blakemorei</i> cepa MV-1*	FP102531	Parcial mam genes contig	107,223	-	55.8	Jogler <i>et al.</i> , 2009
	<i>Magnetospira sp.</i> cepa QH-2	PRJEB1386	Completo	4,020,900	1 (31,063 bp)	59.5 (chr) 54.8 (plsm)	Ji <i>et al.</i> , 2014
	<i>Ca. Magnetococcus massalia</i> cepa MO-1*	LO017727.1	Completo	5,043,095	1 (40,543 bp)	Não divulgado	Não publicado

Deltaproteobacteria	<i>Desulfovibrio magneticus</i> cepa RS-1*	Genome NCBI ID 1358	Completo	5,248,049	1 (58,704 bp) 2 (8,867 bp)	62.8 (chr) 58.0 (plsm1) 37.2 (plsm2)	Sakaguchi, Arakaki e Matsunaga, 2002
	<i>Ca. Magnetoglobus multicellularis</i>	PRJNA52963	Parcial 3,706 contigs	12,453,800	-	37.3	Abreu <i>et al.</i> , 2007
	<i>Ca. Magnetomorum</i> cepa HK-1	PRJNA252699	Parcial 3,036 contigs	14,290,400	-	34.7	Lin <i>et al.</i> , 2018
	<i>Ca. Desulfamplus magnetomortis</i> cepa BW-1*	PRJEB589	Parcial Genes <i>mam</i>	254,780	-	41.0	Lefèvre <i>et al.</i> , 2011b
	Deltaproteobacterium cepa ML-1	JX869936 JX869937	Partial (<i>mam</i> genes)	13,272 21,411	-	61.7 62.3	Lefèvre <i>et al.</i> , 2013a
Nitrospirae	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>	LACI00000000	Parcial 2,752 contigs	6,310,440	-	47.3	Kolinko <i>et al.</i> , 2016
	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>	JZJI00000000	Parcial 1,019 contigs	3,816,930	-	40.4	Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>Ca. Magnetobacterium casensis</i>	JMFO00000000	Parcial 70 contigs	3,415,680	-	48.9	Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> cepa HCH-1	LNQR00000000	Completo	3,593,273	-	45.4	Lin <i>et al.</i> , 2017
Omnitrophica	<i>Ca. Omnitrophus magneticus</i> cepa SKK-01	JYNY00000000	Parcial 656 contigs	3,145,900	-	35.8	Kolinko <i>et al.</i> , 2016
Latescibacteria	<i>Latescibacteria bacterium</i> SCGC AAA252-B13	ASWY00000000	Parcial 138 contigs	1,759,980	-	40.9	Rinke <i>et al.</i> , 2013 Lin <i>et al.</i> , 2018

*cultivada

Como pode ser observado na tabela 1, a maior parte dos genomas de bactéria magnetotática disponível pertence ao filo *Proteobacteria*, principalmente Alphaproteobacteria, pois são cultivadas mais facilmente. *M. magneticum* cepa MS-1, espécie pertencente à esta classe, foi a primeira bactéria magnetotática a ser usada em estudos moleculares, mostrando que alguns genes desta bactéria poderiam ser expressos em *Escherichia coli* (Schüler e Frankel, 1999).

A evolução da magnetotaxia ainda é um ponto de intensa discussão na comunidade científica devido a sua grande dispersão de espécies magnetotáticas no domínio Bacteria e a organização diversificada dos genes de biomineralização. Com isso, foram desenvolvidas três hipóteses sobre a evolução destes microrganismos.

A primeira hipótese levantada é a de que as bactérias magnetotáticas produtoras de magnetossomos de magnetita evoluíram independentemente das bactérias que sintetizam magnetossomos de greigita (DeLong, Frankel e Bazylinski, 1993). Esta hipótese foi fundamentada no conhecimento de que todas as bactérias magnetotáticas descritas da classe Alphaproteobacteria são produtoras de magnetita, enquanto as produtoras de greigita são parte de Deltaproteobacteria. Além disso, os requisitos bioquímicos e nutricionais de cada mineral são diferentes entre si, o que indicaria que as bactérias necessitam de diferentes aparatos metabólicos e genéticos para biomineralizar cada um dos materiais.

A segunda hipótese conhecida é baseada em uma origem monofilética das bactérias magnetotáticas (Abreu et al., 2011; Lefèvre *et al.*, 2013b), ou seja, estes microrganismos possuem um ancestral comum e os genes de biomineralização foram se perdendo ao longo da evolução dos procariotos, o que explicaria a alta diversidade de bactérias magnetotáticas na filogenia e a existência de espécies não magnetotáticas.

A terceira, e última, hipótese explica a diversidade de bactérias magnetotáticas na filogenia através de transferência horizontal de genes de biomineralização (Schübbe *et al.*, 2003; Ritcher *et al.*, 2007; Jogler *et al.*, 2009a, Jogler e Schüler, 2009). A partir destes fenômenos, as bactérias de diferentes grupos taxonômicos foram adquirindo e perdendo os genes responsáveis pela produção dos magnetossomos. Múltiplos e sucessivos eventos de transferência horizontal de genes podem ter sido responsáveis pelo espalhamento da magnetotaxia em filos distantes evolutivamente. Um exemplo que pode explicar esta hipótese é a transdução. Esta hipótese é apoiada pela descoberta de profagos em bactérias magnetotáticas (Schübbe *et al.*, 2009; Rioux *et al.*, 2010; Lefèvre e Bazylinski, 2013) em

regiões próximas aos *operons* que contém os genes de magnetotaxia (Rioux *et al.*, 2010) indicando que estes genes podem ser transferidos por transdução para outras bactérias.

Porém, recentemente, foi sugerido que as hipóteses de origem monofilética e a transferência horizontal de genes poderiam coexistir (Lin *et al.*, 2017). Em Lin *et al.* (2017), é sugerido que os genes de biomineralização e a organização dos magnetossomos na célula tiveram origem na divergência entre os filós *Proteobacteria* e *Nitrospirae* no período Arqueano, época em que havia altas concentrações de ferro nos oceanos além da Terra ainda não ter passado por eventos de oxigenação. Devido a esta descoberta, foi indicado que a evolução da magnetotaxia se deu por pressão ecológica, visto que é um comportamento que dá uma vantagem evolutiva às bactérias deste grupo, logo não necessariamente é uma hipótese ou outra que está correta, já que pode ter existido um ancestral comum e ainda ocorrer transferência horizontal de genes.

1.4. O filo *Nitrospirae*

Outro filo no qual são encontradas bactérias magnetotáticas é o filo *Nitrospirae*. Até hoje ainda não foram isolados representantes magnetotáticos deste grupo em cultura pura. Logo, todas as informações existentes sobre este grupo foram obtidas através de técnicas independentes de cultivo, que incluem microscopias, filogenia molecular e metagenômica. A primeira bactéria magnetotática do filo *Nitrospirae* a ser caracterizada foi *Ca. Magnetobacterium bavaricum* (Jogler *et al.*, 2010), utilizando técnicas independentes de cultivo através da análise do rRNA 16S (Jogler *et al.*, 2010). Além disso, seu genoma foi o primeiro descrito do filo, através de metagenômica (Jogler *et al.*, 2009b).

Outros representantes são: *Ca. Magnetoovum mohavensis* cepa LO-1, um ovoide considerado grande quando descrito (Lefèvre *et al.*, 2011c), e cepa MWB-1, *Ca. Magnetoovum chiemensis* cepa CS-4 (Kolinko *et al.*, 2016), *Ca. Magnetobacterium casensis* cepa Mcas (Lin *et al.*, 2014a), *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1 (Lin *et al.*, 2017) e *Ca. Thermomagnetovibrio paiutensis* cepa HSMV-1 (Lefèvre *et al.*, 2010), sendo esta última uma das primeiras bactérias magnetotáticas caracterizada como moderadamente termófila recuperada a partir de fontes hidrotermais (temperatura variando de 32°C a 63°C) (Lefèvre *et al.*, 2011c). A maioria dos membros do filo *Nitrospirae* são bastonetes que produzem múltiplas cadeias de magnetossomos de magnetita de morfologia anisotrópica (Lefèvre *et al.*, 2011d) (Figura 10). Porém, já foram descritos representantes do filo de

morfologia ovoide, cocoide e vibrião. A maioria dos representantes magnetotáticos do filo *Nitrospirae* foram encontrados em ambientes considerados extremos, como a própria espécie e *Ca. Thermomagnetovibrio pautensis* cepa HSMV-1, citada anteriormente, e a bactéria estudada neste trabalho, por exemplo.

Já foram descritas a participação de representantes magnetotáticos do filo *Nitrospirae* no ciclo do Ferro, por possuírem, muitas vezes, incontáveis cristais dentro da célula. Além do ciclo do Ferro, já foi visto o papel de *Ca. Magnetobacterium casensis* na fixação de carbono (Lin *et al.*, 2014).

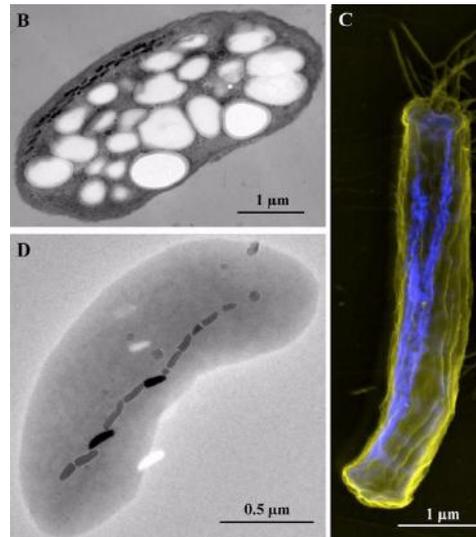


Figura 10. Microscopias de representantes do filo *Nitrospirae*. **B.** Microscopia eletrônica de transmissão de célula pertencente à espécie *Ca. Magnetoovum mohavensis*. **C.** Microscopia eletrônica de transmissão por varredura colorida artificialmente de célula pertencente à espécie *Ca. Magnetobacterium bavaricum*. **D.** Microscopia eletrônica de transmissão de célula pertencente a espécie não-cultivada *Ca. Thermomagnetovibrio pautensis*. **(A)** foi retirada por não se adequar ao propósito deste trabalho. Figura retirada e adaptada de Lefèvre e Bazylinski (2013).

2. JUSTIFICATIVA

A síntese de magnetossomos e o comportamento magnetotático são fenótipos amplamente distribuídos no domínio Bacteria, sendo o filo *Nitrospirae* o mais antigo com representantes magnetotáticos considerando a evolução do domínio e, por isso, de grande importância para o entendimento da evolução desse grupo de microrganismos (Lin *et al.*, 2017). Descrever uma nova espécie de bactéria magnetotática, mesmo que não cultivada, e analisar seu genoma é importante para fundamentar o conhecimento e embasar pesquisas posteriores sobre a evolução da magnetotaxia e potencial metabólico da espécie, o que pode auxiliar na definição da composição de cultivo para seu isolamento. O estudo da bactéria

magnetotática encontrada em fontes termais do deserto de Mojave, em Goldstrike, EUA, tem potencial para enriquecer o conhecimento sobre a diversidade e evolução da biomineralização no domínio Bacteria. Já que ambientes termais foram raramente explorados no estudo de bactérias magnetotáticas, principalmente no que diz respeito aos genes de biomineralização, uma vez que esses não foram descritos para esse grupo de bactéria magnetotática moderadamente termófilo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Descrever uma nova espécie de bactéria magnetotática encontrada em fontes termais do deserto de Mojave, em Goldstrike, Nevada, EUA, sob os aspectos morfológicos e filogenéticos.

3.2. Objetivos específicos

- Aspectos morfológicos:
 - i. Avaliar a morfologia da célula através de técnicas de microscopia e medição da célula e dos magnetossomos.
 - ii. Identificar a morfologia dos magnetossomos através de microscopia eletrônica de transmissão e medição dos cristais.
- Aspectos filogenéticos:
 - iii. Anotação automática do genoma.
 - iv. Predição de genes de biomineralização (*mam*).
 - v. Predição de genes relacionados a vias metabólicas.
 - vi. Identificar à que filo, gênero e espécie a bactéria em estudo pertence.
 - vii. Produção de árvores filogenéticas (baseadas no gene que codifica o rRNA 16s e nas proteínas Mam).
 - viii. Nomear espécie

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta das amostras

As análises deste estudo foram feitas a partir de amostras de água e sedimento coletadas em jarras de vidro de 1 L pela professora Fernanda de Ávila Abreu, professora

adjunta do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, durante seu período de pós-doutorado nos Estados Unidos em 2016. As fontes termais de Goldstrike são um complexo de fontes de água doce represadas artificialmente em pequenos poços utilizados para banho recreativo. A temperatura da água e sedimento do local de coleta foi de 38° C.

4.2. Microscopia óptica

As amostras foram acondicionadas no laboratório na Universidade de Nevada, Las Vegas, EUA, e o enriquecimento das bactérias magnetotáticas foi feito colocando-se um ímã na parte externa do recipiente de coleta. Após 30 minutos as bactérias magnetotáticas foram coletadas desse ponto no qual o ímã foi colocado com auxílio de pipeta Pasteur e transferidas para tubo de polipropileno de 1,5 mL. Alíquotas dessa amostra enriquecida foram observadas pela técnica da gota pendente no microscópio Axio Imager (Zeiss, Alemanha) equipado com sistema de aquisição digital de imagens e acessórios para contraste de fase e contraste interferencial diferencial de Nomarski. Através de imagens de microscopia óptica, previamente obtidas pela professora Fernanda de Ávila Abreu nos EUA, foram feitas as medições do diâmetro celular médio e fator de forma, que é a razão entre diâmetro mínimo e o máximo, com o intuito de classificar a morfologia da bactéria.

4.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Após o enriquecimento magnético descrito acima, alíquotas de 10 µl foram transferidas para grades de cobre revestidas com filme suporte de formvar e carbono. Após 10 minutos, o excesso de amostra foi retirado com papel de filtro e a grade foi armazenada até observação. Essas grades foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão Morgagni (FEI Company, EUA) operando a 80 kV equipado com câmera digital MegaView G2 Camera (Olympus, Japão). A partir dessas imagens, o comprimento, largura e fator de forma (definido como largura/comprimento) dos magnetossomos foram medidos através do programa iTEM software (Olympus, Japão).

Para identificação do mineral do magnetossomos na célula, amostras enriquecidas magneticamente foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1M), e enviadas para o Brasil, onde foram feitas as análises seguintes. Em seguida, a amostra foi lavada no mesmo tampão três vezes, com intervalos de 15 minutos entre as lavagens. A amostra foi submetida a pós-fixação com tetróxido de ósmio (1%) em cacodilato

de sódio (0,1M) por uma hora. Em seguida, nova etapa de lavagem foi realizada como descrito anteriormente. Então, a amostra foi submetida ao processo de desidratação gradativa em acetona 30%, 50%, 70%, 90% e 100% com intervalos de 15 minutos entre cada etapa. Foi adicionada uma mistura de 1:2 de resina PolyBed 812 e acetona (100%), respectivamente. No dia seguinte, essa mistura foi substituída por uma nova mistura de concentração 1:1 de acetona (100%) e resina. Após 8 horas, a mistura foi substituída por resina pura. Essa etapa foi repetida uma vez. A resina contendo o espécime foi polimerizada em estufa a 60°C por 72 horas. Cortes ultrafinos foram obtidos com ultramicrotomo Leica EM U6, que foram depositados em grades de cobre para microscopia eletrônica de 300 *mesh*.

4.4. Amplificação, sequenciamento e montagem do genoma

Após o enriquecimento magnético, a técnica de *race-track* (Wolfe, Thauer e Pfennig, 1987) foi feita para diminuir a possibilidade de contaminação por outras bactérias não magnetotáticas. Após essa purificação, o DNA genômico total foi amplificado utilizando o kit comercial REPLI-g *Single Cell* (QIAGEN). A amostra foi enviada para sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, EUA) pelo método de *paired-end* com de 150 bp. O genoma foi montado utilizando o software CLC Genomics Workbench (CLC Bio, QIAGEN, Aarhus, Dinamarca).

4.5. Anotação do genoma

A anotação do genoma foi feita automaticamente pelo servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008). Porém os genes relacionados a enzimas chaves de vias metabólicas e a proteínas relacionadas a características importantes como a de fixação de carbono e nitrogênio, metabolismo do enxofre, profagos e motilidade, foram anotados por análise de melhor *hit* bidirecional (Wolf e Koonin, 1999) baseada na homologia de sequências de proteínas codificadas por eles, de acordo com a tabela abaixo (Tabela 2)

Tabela 2. Vias metabólicas a serem analisadas e suas respectivas enzimas chaves.

Via	Enzima	Microrganismo de referência
Ciclo do Acetil-CoA	Acetil descarboxilase (KJR41451.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>
Ciclo do Ácido Cítrico	Formato desidrogenase (KJR41728.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>
	Acetato quinase (KJU85871.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>
	Formil-THF sintetase (AFA47717.1)	<i>Acetobacterium woodii</i>
	Metileno-THF desidrogenase (AAW60566.1)	<i>Gluconobacter oxydans</i>

	Metiltransferase CheR (KJR43151.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>
	Acetato quinase (KJU85871.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>
Fixação de Nitrogênio	Nitrogenase (KJR40989.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>
Assimilação de Nitrato e Nitrito	Desaminase-like (KJR42769.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>
	Desaminase (KJR41340.1)	
Ciclo de Calvin-Benson-Bassham	Ribulose-1,5-Bifosfato carboxilase/oxigenase (subunidade grande) (KJR41047.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>
	RubisCO (WP_052567263.1)	<i>Ca. Magnetobacterium casensis</i>
	Ribulose-Bifostato carboxilase, parcial (KJU84282.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>
Ciclo de Krebs reverso	Fumarato redutase/succinato desidrogenase, parcial (KJU85719.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>
	ATP citrato liase (WP_062482080.1)	<i>Ca. Nitrospira inopinata</i>
	2-Oxoglutarato sintase, subunidade KorB (BAH75369.1) 2-Oxoglutarato sintase, subunidade KorA (BAH75368.1) 2-Oxoglutarato sintase, subunidade KorC (BAH75370.1)	<i>Desulfovibrio magneticus</i> cepa RS-1
Metabolismo central de Carbono	Acetil-CoA sintetase (KJR41521.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>
	Fosfenolpiruvato carboxicinase (KJR41191.1)	
	Acetil-CoA biotina carboxil carreador (KJR40452.1)	
Desnitrificação	Nitrito redutase (WP_040333821.1)	<i>Ca. Magnetobacterium casensis</i>
	Óxido nítrico redutase (KJU81867.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>
	Óxido nítrico redutase (OYT23964.1)	Óxido nítrico redutase (OYT23964.1)
Metabolismo de Enxofre	Sulfato adenililtransferase (KJR44061.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>
	Cisteína sintetase (KJR41482.1)	
	Domínio da proteína fosfoadenosina fosfosulfato redutase (KJU86684.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>
	Cisteinil-tRNA sintetase (KJU82391.1)	
	Sulfito redutase (OYT20244.1)	<i>Nitrospira</i> sp. UW-LDO-01
	Serina O-acetiltransferase (WP_062487074.1)	<i>Ca. Nitrospira inopinata</i>
	Proteína da família citocromo c (ALA59432.1)	<i>Nitrospira moscoviensis</i>
	Citocromo tipo-c de oxidação de Enxofre SoxX (WP_011713561.1)	<i>Magnetococcus marinus</i> cepa MC-1
	Tiosulfohidrolase SoxB (WP_011713557.1)	
	Sulfito oxidase-like oxidoreductase (WP_005010227.1)	<i>Nitrospina gracilis</i>
Via glicolítica	Fosfogliceromutase (KJR42382.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>
	UDP-fosfato galactose	

	fosfotransferase (KJR40330.1)	
Ciclo oxidativo do ácido cítrico	2-Metilcitrato sintase/citrato sintase II (KJR40308.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>

Foram feitas análises de homologia também para sequências de proteínas codificadas pelos genes *mam* conservados e outros genes relacionados à biomineralização no servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008) e foi montada uma tabela com os organismos mais similares à sequência da bactéria estudada. Além disso, a organização destes genes foi avaliada, comparando-se com os resultados de outras bactérias magnetotáticas cujo genomas estão disponíveis (números de acesso das sequências: *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1: LNQR00000000, *Ca. Magnetobacterium bavaricum*: LACI01001272.1 e *Ca. Magnetoovum chiemensis* cepa CS-04: JZJI01000011.1).

4.7. Análise filogenética

Para preparar a árvore filogenética referente ao gene que codifica o rRNA 16S, as sequências da bactéria magnetotática em estudo e de outras bactérias magnetotáticas, retiradas do NCBI (Ostell e Kans, 1998), foram alinhadas com o programa BioEdit e a árvore foi feita com o programa MEGA v. 7.0 (Kumar, Stecher e Tamura, 2016), utilizando o modelo de máxima verossimilhança e com base no melhor método indicado pelo software. A análise filogenética das proteínas codificadas pelos genes de biomineralização foi realizada da mesma forma utilizando sequências de referências disponíveis no banco de dados do NCBI (Ostell e Kans, 1998). Para cada uma das proteínas analisadas, foi realizada uma avaliação no programa MEGA v. 7.0 (Kumar, Stecher e Tamura, 2016) utilizando a ferramenta *Model Selection* para escolha do melhor método a ser utilizado.

5. RESULTADOS

5.1. Morfologia

Através observação das amostras ambientais concentradas magneticamente foi possível observar apenas células ovoides se deslocando antiparalelamente ao campo magnético em direção a borda da gota (Figura 11A). A observação das células ovoides por microscopia eletrônica de transmissão mostrou a morfologia arredondada das células (Figura 11B). Devido ao fato de a célula ser espessa e eletrondensa, só foi possível a observação de magnetossomos em forma de ponta de lança na periferia celular, que por ser mais fina,

permitia a passagem do feixe de elétrons e formação de imagem dos mesmos (Figura 11C). Apesar de não ser possível a observação de todo conteúdo citoplasmático, a observação da distribuição de magnetossomos na periferia da célula sugere que esses estão organizados em múltiplas cadeias (Figura 11C).

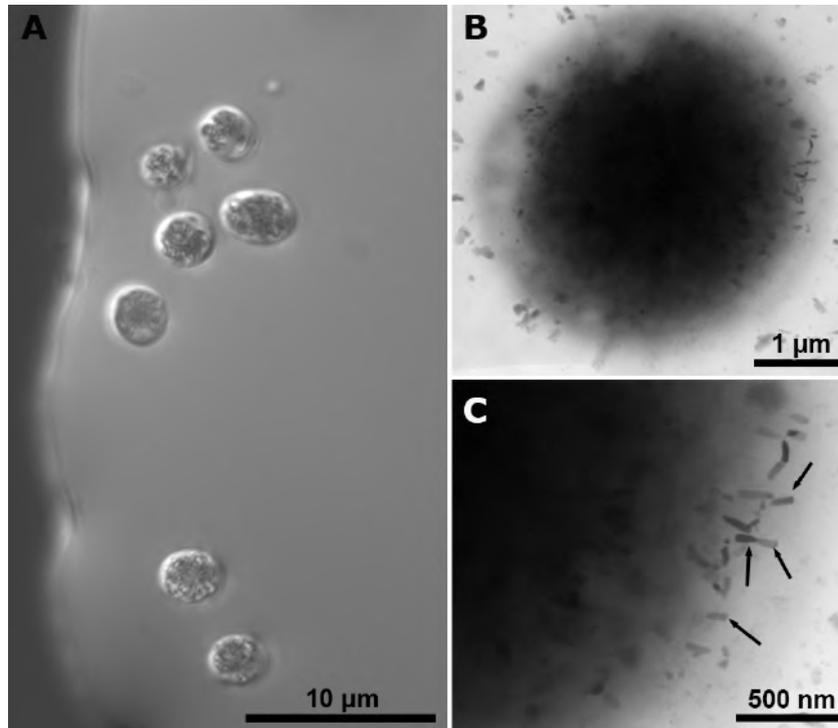


Figura 11. Imagens da bactéria em estudo obtidas por diferentes técnicas de microscopia. **A.** Microscopia óptica por contraste interferencial diferencial de Normaski mostrando a forma oval da célula. **B.** Microscopia eletrônica de transmissão de amostra em grade revestida com formvar e carbono. **C.** Alta magnificação em microscopia eletrônica de transmissão da mesma célula em que é possível visualizar os magnetossomos ponta de lança, indicados pelas setas pretas.

A partir das imagens obtidas pelas técnicas de microscopia, foram feitas análises da distribuição de tamanho e fator de forma das células ovoide, bem como determinação da distribuição e média de comprimento, largura e fator de forma dos magnetossomos.

A distribuição do diâmetro das células mostrou que o tamanho das mesmas variou de 4,5 a 7,5 μm , com média de $5,76 \pm 0,58$ (Figura 12A; $n = 199$). Já o fator de forma variou de 0,6 a 0,9, ou seja, sendo sempre menor do que 1 (Figura 12B), indicando a morfologia ligeiramente ovóide da bactéria.

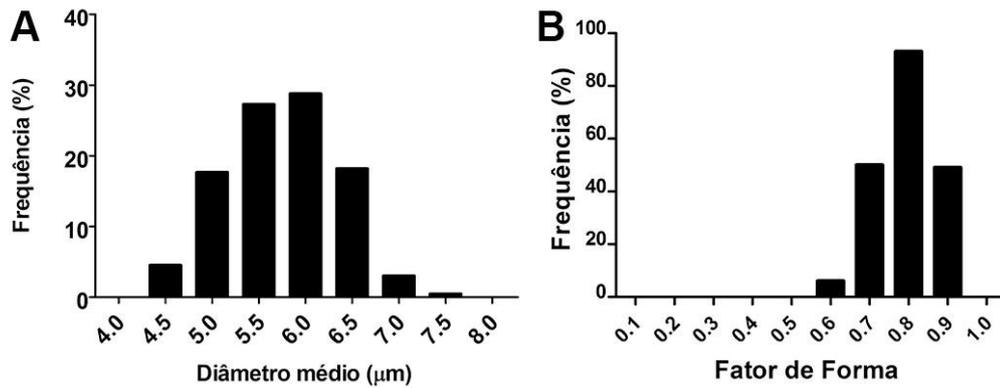


Figura 12. Gráficos de distribuição de diâmetro e fator de forma obtidos a partir da medida do diâmetro de células em imagens de microscopia óptica por contraste interferencial diferencial ($n = 199$). **A.** Distribuição do diâmetro médio, variando de 4,5 a 7,5 μm . **B.** Distribuição do fator de forma (diâmetro mínimo dividido pelo diâmetro máximo), variando entre 0.6 e 0.9.

Em relação a morfologia dos cristais, foi visto que o comprimento dos magnetossomos variou de 80 nm a 120 nm, com média de $102,5 \pm 3,94$ nm (Figura 13A; $n=17$). A largura dos cristais variou de 30 nm e 55 nm, com média de $42,5 \pm 6,7$ nm (Figura 13B; $n = 17$). O fator de forma, que é a razão entre largura e comprimento, variou de 0,3 a 0,45, sendo sempre menor do que 1, o que caracteriza os magnetossomos como alongados.

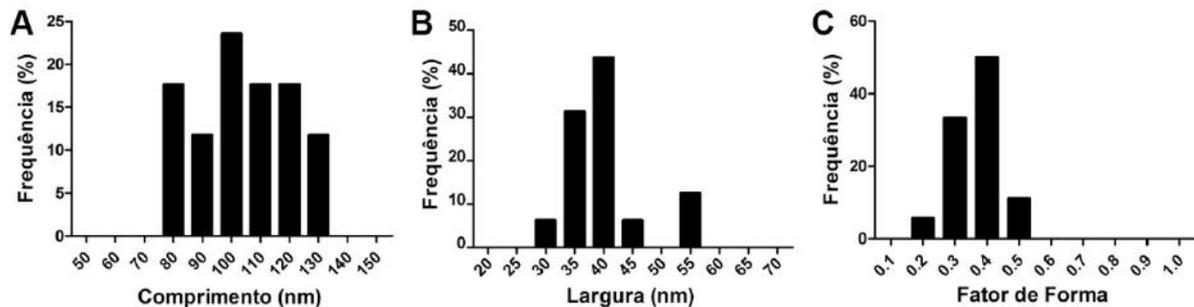


Figura 13. Gráficos de distribuição de comprimento, largura e fator de forma dos magnetossomos, obtidos a partir da medida dos cristais em imagens de microscopia eletrônica de transmissão ($n = 17$). **A.** Distribuição do comprimento dos magnetossomos, variando entre 80 nm e 125 nm com média de $102,5 \pm 3,94$ nm. **B.** Distribuição da largura dos magnetossomos, variando entre 30 nm e 55 nm, com média de $42,5 \pm 6,7$ nm. **C.** Distribuição do fator de forma (razão entre largura e comprimento) variando entre 0,3 e 0,45.

5.2. Análise do genoma

A tabela 3 contém as informações gerais do genoma da bactéria estudada, bem como informações sobre os genomas de outras bactérias magnetotáticas pertencentes ao filo *Nitrospirae*. Dentre os parâmetros utilizados, foram escolhidos os marcadores de qualidade de montagem, como número de *contigs*, tamanho do maior *contig*, N50 e outros. Dentre os genomas comparados, o da bactéria em estudo é o que possui o segundo menor número de *contigs* e o tamanho do maior *contig* está entre os maiores, o que indica uma boa montagem. O genoma em estudo é o que possui menos genes putativos de magnetossomo, porém possui a maior região correspondente à MAI comparada às outras bactérias da tabela.

Tabela 3. Dados gerais obtidos a partir do sequenciamento e montagem do genoma da bactéria magnetotática estudada. Nesta tabela, são descritas as características gerais do genoma parcial do ovoide magnetotático encontrado em Goldstrike em comparação ao genoma parcial de outras bactérias magnetotáticas do filo *Nitrospirae* (Kolinko *et al.*, 2016).

Parâmetro	Ovoide de Goldstrike	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> cepa CS-4	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>	<i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> cepa HCH-1
Tamanho total do genoma (Mb)	2.81	3.90	6.30	3.59
Conteúdo GC (%)	45.80	40.40	47.40	45.40
Número de <i>contigs</i>	188	1402	4211	152
N50* (Kb)	12.31	9.66	4.57	45.77
Tamanho do maior <i>contig</i> (Kb)	145	43.15	67.96	150.22
Número de sequências codificantes	2881	4527	8277	3415
Número de tRNAs	17	45	69	47
Número de cópias do <i>operon</i> rRNA	1	1	1	1
Tamanho total da MAI* (Kb)	88.42	27.90	46	18.14
Número de genes de biomineralização putativos	9	21	30	20

*N50 - 50% da montagem está em *contigs* maiores que este valor; MAI – Ilha do magnetossomo.

5.3 Filogenia baseada no gene que codifica o rRNA 16S

A análise de similaridade do gene que codifica o rRNA 16S por BLASTn entre a sequência anotada do ovoide de Goldstrike e aquelas depositadas no banco de dados mostrou maior similaridade (91%) com as sequências de *Ca. Magnetoovum chiemensis* cepa CS-4, espécie pertencente ao filo *Nitrospirae*. A análise filogenética baseada nesse gene mostrou

maior proximidade da bactéria em estudo com *Ca. Magnetoovum chiemensis* cepa CS-4 (Figura 14), assim como nas análises por BLASTn. Essas duas espécies foram agrupadas separadamente das demais bactérias magnetotáticas afiliadas a *Nitrospirae*, sendo que a similaridade máxima entre as bactérias dos dois grupos é 89%, indicando que as duas espécies pertencem a gêneros diferentes. Em comparação às outras espécies do filo *Nitrospirae* mais distantes, sendo essas MWB-1, *Ca. Magnetobacterium bavaricum*, M3Y-B, *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1, *Magnetococcus* sp. cepa MHB-1, *Ca. Magnetoovum mohavensis* cepa LO-1, a divergência entre as sequências desse gene foram de 9,2; 9,7; 10,4; 11; 11 e 10%, respectivamente.

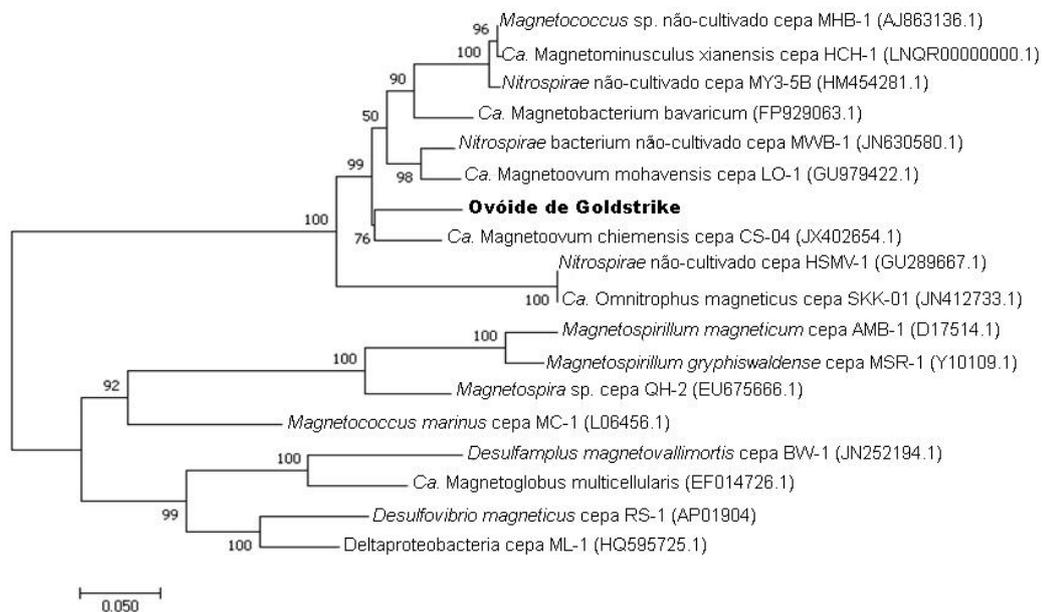


Figura 14. Árvore filogenética baseada no gene que codifica o rRNA 16S utilizando o método de máxima verossimilhança. Foi utilizado o modelo de Kimura 2-parâmetros com distribuição Gamma com sítios invariantes (G+I) (Kimura, 1980). A barra de escala indica 5% de divergência entre as sequências. O número de acesso das sequências está descrito entre parênteses após o nome da espécie. Os valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 réplicas.

5.4 Análises dos genes de biomineralização conservados

A partir de análises de homologia para sequências de proteínas codificadas pelos genes *mam* conservados foi montada uma tabela com os organismos mais similares à sequência da bactéria estudada (Tabela 4), mostrando que o *best hit* para para MamA, MamB, MamP, MamQ-I e MamQII foi *Ca. Magnetoovum chiemensis*, para MamE e MamI foi um

representante do filo *Nitrospirae* não cultivado, para MamK foi *Ca. Magnetomorum* sp. cepa HK-1, para MamM foi *Ca. Magnetobacterium bavaricum* e para MamQ-I foi *Ca. Magnetobacterium casensis*. Além dos genes *mam*, após a anotação automática no servidor RAST, foi possível identificar genes *mad* no genoma da bactéria através de análise de homologia, os quais estão relacionados com a produção de magnetossomos ponta de lança, sendo estes *mad11* (mais próximo de *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1), *mad23* (mais próximo de *Ca. Magnetoovum chiemensis*), *mad24* (mais próximo de *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1), *mad25* (mais próximo de *Ca. Magnetoovum chiemensis*), *mad26* (mais próximo de *Ca. Magnetoovum chiemensis*), *mad28-2* (mais próximo de *Ca. Magnetoovum chiemensis*) e *mad31* (*Ca. Magnetoovum chiemensis*).

Tabela 4. Tabela relacionando os *best hits* da análise de homologia para sequências de proteínas codificadas pelos genes de biomineralização conservados por BLASTp.

Proteína	Microrganismo mais próximo	E-value	Similaridade	Positivos
MamA	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> (KJR43885.1)	6e-35	58%	78%
MamB	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> (KJR43883.1)	2e-157	69%	87%
MamE	<i>Nitrospirae</i> não cultivado (AMP41544.1)	2e-170	47%	65%
MamI	<i>Nitrospirae</i> não cultivado (AMP41562.1)	5e-23	59%	73%
MamK	<i>Ca. Magnetomorum</i> sp. cepa HK-1 (HPA14283.1)	3e-175	68%	85%
MamM	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i> (KJU84850.1)	2e-114	60%	78%
MamP	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> (KJR41428.1)	3e-77	65%	75%
MamQ-I	<i>Ca. Magnetobacterium casensis</i> (WP_052567105.1)	2e-90	54%	71%
MamQ-II	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> (KJR43882.1)	6e-31	39%	63%
Mad11	<i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> cepa HCH-1 (KWT94827)	8e-14	59%	61%
Mad23	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> (KJR42124.1)	2e-101	52,98%	70%
Mad24	<i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> cepa HCH-1 (KWT94845.1)	2e-21	31%	52%
Mad25	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> (KJR42126.1)	1e-52	43,18%	94%
Mad26	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> (KJR42127.1)	6e-28	33%	64%
Mad28-2	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> (KJR44079.1)	2e-177	61%	80%
Mad31	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>	1e-73	52%	77%

	(KJR43881.1)			
Man2	<i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> cepa HCH-1 (KWT94827)	8e-14	56%	69%

As análises filogenéticas baseadas nas sequências de proteínas Mam, sendo estas MamA, MamB (Figura 15A e B), MamE, MamK (Figura 16 A e B), MamP e MamQ (Figura 17 A e B), foram feitas utilizando o melhor método para cada uma delas indicado pelo programa MEGA. Nestas análises foi visto que apenas em relação à MamA (Figura 15A) e MamP (Figura 17A) a bactéria mais próxima do ovoide em estudo é *Ca. Magnetoovum chiemensis* cepa CS-4, a mesma mais similar quando analisado o gene que codifica o rRNA 16S. Em relação à MamB (Figura 15B) a mais próxima é *Ca. Magnetobacterium casensis*, na análise de MamE (Figura 16A) a mais próxima é *Ca. Omnitrophus magneticus* cepa SKK-1, na de MamK (Figura 16B) são *Ca. Magnetoovum chiemensis* cepa CS-4 e *Ca. Omnitrophicus magneticus* cepa SKK-1, e MamQ são uma espécie do filo *Nitrospirae* não-cultivada, *Ca. Magnetobacterium casensis* e *Ca. Magnetobacterium bavaricum*.

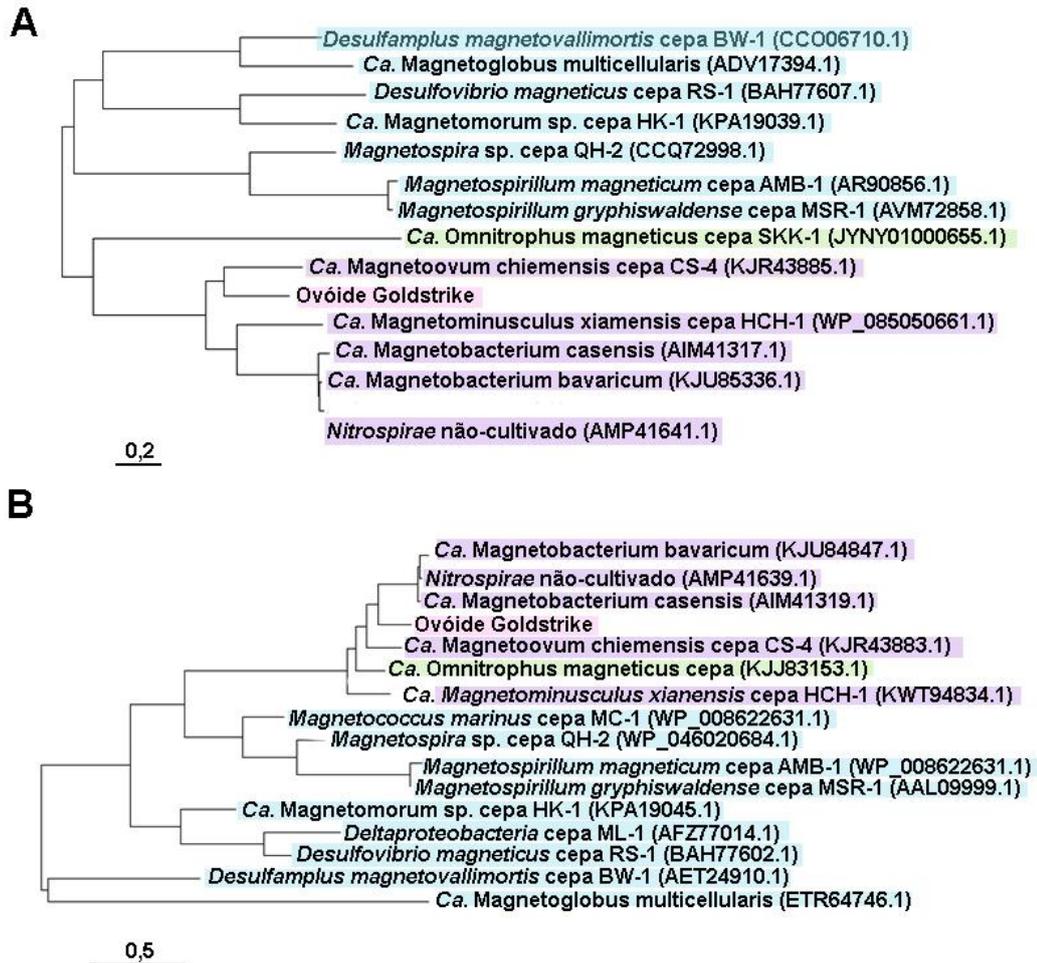


Figura 15. Árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de proteínas MamA (A) e MamB (B), nas quais foi utilizado o método de máxima verossimilhança. A barra de escala está indicada na imagem. O número de acesso das sequencias está descrito entre parênteses após o nome da espécie estudada. Azul indica *Proteobacteria*, roxo indica *Nitrospirae*, verde indica *Omnitrophica* e rosa indica a bactéria em estudo.

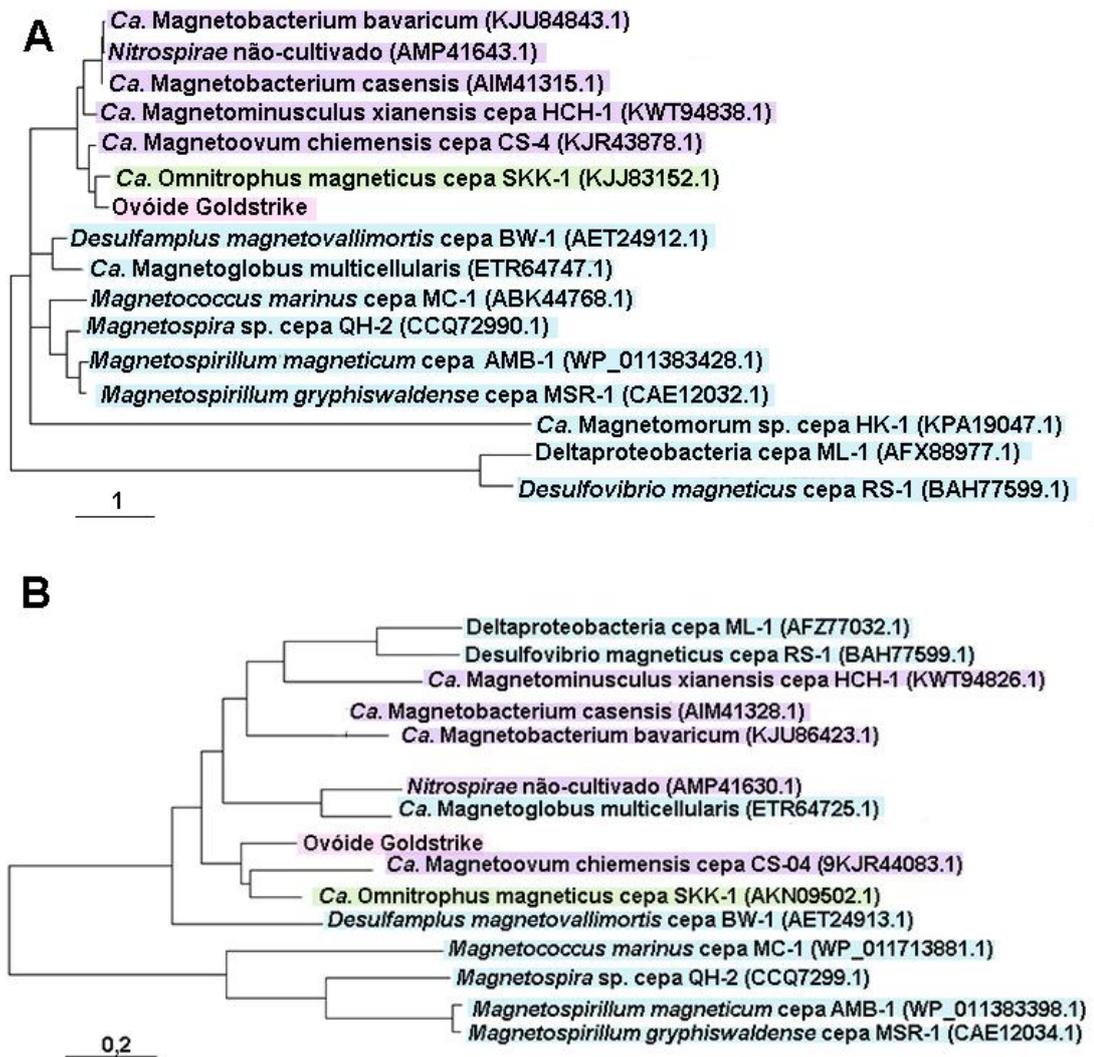


Figura 16. Árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de proteínas MamE (A) e MamK (B), nas quais foi utilizado o método de máxima verossimilhança. A barra de escala está representada na imagem. O número de acesso das sequencias está descrito entre parênteses após o nome da espécie estudada. Azul indica *Proteobacteria*, roxo indica *Nitrospirae*, verde indica *Omnitrophica* e rosa indica a bactéria em estudo.

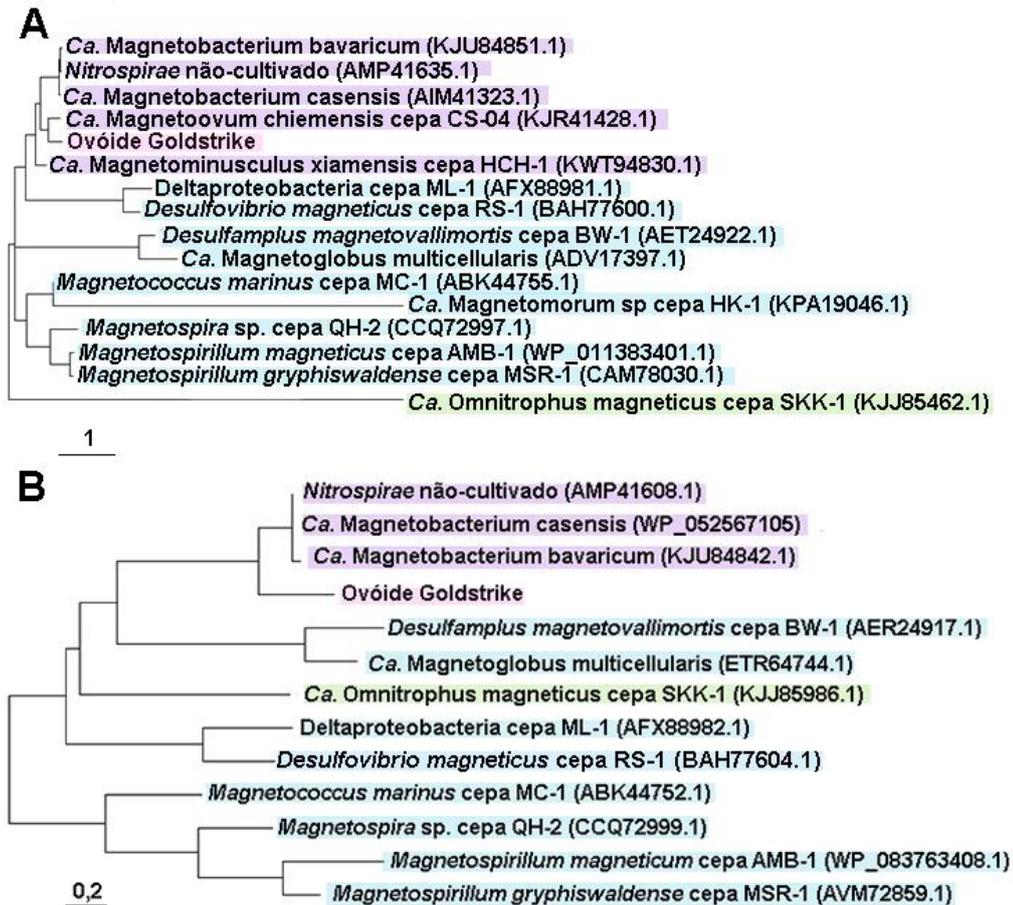


Figura 17. Árvores filogenéticas baseadas nas sequências de proteínas MamP (A) e MamQ (B), nas quais foi utilizado o método de máxima verossimilhança. A barra de escala está indicada na imagem. O número de acesso das sequencias está descrito entre parênteses após o nome da espécie estudada. Azul indica *Proteobacteria*, roxo indica *Nitrospirae*, verde indica *Omnitrophica* e rosa indica a bactéria em estudo.

A caracterização da MAI é de suma importância para o entendimento do genoma de bactérias magnetotáticas, tanto no que diz respeito à homologia entre sequências quanto à organização dos genes (Tabela 4). Logo, a partir dos resultados da anotação automática foi feito uma ilustração indicando a organização da ilha do magnetossomo da bactéria em estudo. O esquema foi montado seguindo Lin *et al.* (2017). Foi observada a organização dos genes em *clusters*, intercalados por proteínas hipotéticas, *mad* e *man*, diferentemente das outras espécies que possuem outros genes inseridos na MAI. Esta organização foi comparada com a de outros representantes do filo *Nitrospirae* e esquematizada na figura 18, mostrando que os genes *mamA*, *mamB*, *mamE*, *mamI*, *mamK*, *mamM*, *mamP* e *mamQ* são conservados entre os *Nitrospirae*. É possível observar que a organização dos genes *mam* da espécie em estudo

segue a ordem de posicionamento dos genes *mam* de *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1. Porém, os outros genes que estão inseridos na MAI são diferentes.

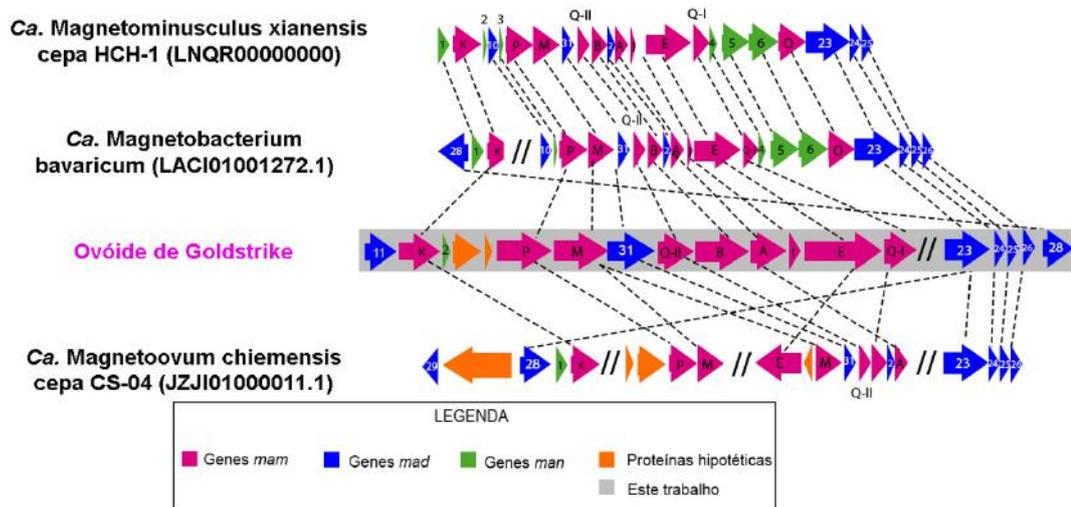


Figura 18. Ilustração indicando a organização dos genes *mam* de representantes do filo *Nitrospirae*, sendo estes *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1, *Ca. Magnetobacterium bavaricum*, *Ca. Magnetoovum chiemensis* cepa CS-04 e a espécie em estudo. Rosa indica os genes *mam*, laranja indica proteínas hipotéticas, azul indica os genes *mad* e verde indica os genes *man*.

5.4 Análise do potencial metabólico das células baseado no conteúdo genético

A análise por homologia dos genes que codificam para enzimas-chave de vias metabólicas importantes (Tabela 5) mostrou que a bactéria em estudo possui genes para as seguintes vias: redução de acetil-coA, por possuir gene que codifica para acetil descarboxilase; ciclo do ácido cítrico, por possuir gene que codifica para formato desidrogenase e acetato quinase; fixação de nitrogênio, por possuir genes que codificam para a enzima nitrogenase (*nifE* e *nifN*); ciclo de Calvin-Benson-Bassham, por possuir genes para rubisCO, ribulose-bifosfato carboxilase e ribulose-1,5-carboxilase; Ciclo de Krebs reverso, por possuir genes para fumarato redutase/succinato desidrogenase, 2- oxoglutarato sintase subunidades KorA, KorB e KorC; metabolismo central de carbono, por ter genes para acetil-coA sintetase e biotina; metabolismo de enxofre, por ter genes para sulfato adeniltransferase, sulfito redutase, cisteinil-tRNA sintetase e cisteína sintase (Tabela 5). Genes que codificam as demais proteínas para as quais foi realizada a busca utilizando a ferramenta de comparação de melhor hit bidirecional no servidor RAST (Tabela 2) não tiveram resultados relevantes, como por exemplo o gene que codifica para a enzima desaminase, que possui papel na assimilação

de nitrato, ATP citrato liase, 2-Metilcitrato sintase/citrato sintase II, que possui papel no ciclo oxidativo do ácido cítrico, Citocromo tipo-c de oxidação de Enxofre SoxX, que exerce função no metabolismo de enxofre e fumarato redutase/succinato desidrogenase, que participa do ciclo de Krebs reverso.

Tabela 5. Resultados da análise por homologia por melhor hit bi-direcional de genes que codificam enzimas chave de vias metabólicas importantes.

Via	Enzima	Melhor hit	E-value	Similaridade	Positivos
Redução de acetil-coA	Acetil descarboxilase (KJR41451.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>	0,0	86%	93%
Ciclo do ácido cítrico	Formato desidrogenase (KJR41728.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>	6e-39	28%	45%
	Acetato quinase (KJU85871.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>	0,0	59%	77%
Fixação de nitrogênio	Nitrogenase (KJR40989.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>	0,0	59%	72%
Assimilação de nitrato e nitrito	Desaminase (KJR42769.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>	0,29	28%	45%
Ciclo de Calvin-Benson-Bassham	RubisCO (WP_052567263.1)	<i>Ca. Magnetobacterium casensis</i>	0,0	51%	69%
	Ribulose-bifosfato carboxilase (KJU84282.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>	2e-82	48%	69%
	Ribulose-1,5-Bifosfato carboxilase (KWT95165.1)	<i>Ca. Magnetominusculus xianensis cepa HCH-1</i>	0,0	53%	70%
Ciclo de Krebs reverso	Fumarato redutase/succinato desidrogenase (KJU85719.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>	4e-15	50%	67%
	ATP citrato liase (WP_062482080.1)	<i>Ca. Nitrospira inopinata</i>	2,1	26%	51%
	2-Oxoglutarato sintase subunidade KorB (BAH75369.1)	<i>Desulfovibrio magneticus</i>	8e-31	30%	49%
	2-Oxoglutarato sintase subunidade KorA (BAH75368.1)		1e-57	34%	50%
	2-Oxoglutarato sintase subunidade KorC (BAH75370.1)		3e-16	34%	50%
Metabolismo central de carbono	Acetil-coA sintetase (KJR41521.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>	0,0	81%	89%
	Biotina (KJR40452.1)		2e-44	53%	69%
Metabolismo	Sulfato	<i>Ca. Magnetoovum</i>	0,0	87%	93%

de enxofre	adeniltransferase (KJR44061.1)	chiemensis			
	Sulfito redutase (OYT20244.1)	<i>Nitrospira</i> sp.	7e-11	38%	65%
	Cisteinil-tRNA sintetase (KJU82391.1)	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>	0,0	61%	78%
	Cisteína sintase (KJR41482.1)	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i>	2e-05	40%	59%

7. DISCUSSÃO

A descrição de microrganismos não cultiváveis é uma difícil tarefa, já que grande parte dos seus genomas conhecidos são parciais, o que gera perda de informação genética. Visto a importância destes microrganismos não-cultiváveis, o Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos, em 2002 (Stackebrandt *et al.*, 2002), estabeleceu que a condição *Candidatus* deve ser atribuída a bactérias bem descritas, mas que ainda não foram cultivadas. Dentre os requisitos para o estado *Candidatus* encontram-se informações genéticas, morfológicas, características metabólicas, estruturais, ambientais e/ou reprodutivas.

A maior parte das espécies de bactérias magnetotáticas é descrita através de técnicas independentes de cultivo. Porque este grupo necessita de uma baixa concentração de oxigênio para sobreviver e crescer em cultura, e, no ambiente, vivem em ambientes com gradientes químicos bem definidos, o que é difícil de reproduzir em laboratório, além de outras exigências metabólicas (Lins *et al.*, 2003). Estas características tornam o cultivo destes microrganismos muito difícil. A facilidade na caracterização dessas bactérias ocorre devido ao fácil enriquecimento de amostras ambientais pela aplicação de um campo magnético (Abreu *et al.*, 2007; Lefèvre *et al.*, 2010; Bazylnski *et al.*, 2013). Além disso, o grupo ainda apresenta uma característica peculiar que é a biomineralização de magnetossomos por um processo geneticamente controlado, que permite a especificação de características inerentes a cada espécie. Até o momento, por exemplo, todas as espécies de bactérias magnetotáticas afiliadas ao filo *Nitrospirae* não foram cultivadas em culturas de enriquecimento ou axênicas e suas caracterizações foram realizadas por diferentes técnicas independentes de cultivo, inicialmente através de técnicas de microscopia (Vali *et al.*, 1987) e, atualmente, através do sequenciamento parcial de genoma e análise filogenética (Jogler *et al.*, 2010). Logo, toda a informação disponível sobre este filo se dá por técnicas de microscopia, filogenia baseada em marcadores filogenéticos, mais comumente o gene que codifica o rRNA 16S e metagenômica,

o que mostra a grande importância destas metodologias no estudo de bactérias magnetotáticas.

Comparado com outras espécies de bactérias magnetotáticas, a bactéria ovoide em estudo possui diâmetro consideravelmente maior do que a maioria das espécies de bactéria magnetotática ovoide descritas até o momento, se aproximando ao tamanho do organismo multicelular magnetotático pertencente a espécie *Ca. Magnetoglobus multicellularis* (Abreu *et al.*, 2007). A espécie em estudo ainda possui diâmetro médio maior ($5,76 \pm 0,58 \mu\text{m}$) do que *Ca. Magnetoovum mohavensis* cepa LO-1, que já era considerado um ovoide grande, com dimensões $3,5 (\pm 0,5 \mu\text{m})$ por $2,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ($n = 53$) (Lefèvre *et al.*, 2011c).

Até o momento bactérias magnetotáticas afiliadas ao filo *Nitrospirae* apresentaram magnetossomos de magnetita com morfologia anisotrópica com formato ponta-de-lança organizados em múltiplas cadeias, como os da espécie *Ca. Magnetobacterium bavaricum* e de *Ca. Magnetoovum mohavensis* cepa LO-1 (Figura 10) (Lefèvre e Bazylinski, 2013). As únicas exceções são as bactérias magnetotáticas *Ca. Thermomagnetovibrio paiutensis* cepa HSMV-1 e *Magnetococcus* sp. cepa MHB-1, que possui uma única cadeia de cristais anisotrópicos com formato de ponta de lança, mas esses também são de magnetita. Associado com as medidas do magnetossomos, que também não estão fora do conhecido, é possível identificar que estes cristais não fogem dos padrões do filo já descritos na literatura (Tabela 6).

Tabela 6. Tabela sintetizando informações sobre a morfologia de espécies pertencentes ao filo *Nitrospirae* já descritos na literatura.

Espécie	Morfologia celular	Tamanho celular	Morfologia dos magnetossomos	Composição dos magnetossomos	Organização dos magnetossomos	Tamanho dos magnetossomos
Ovoide de Goldstrike	ovoide	5,76 μm	Ponta de lança	Não determinada	Múltiplas cadeias	102,5 nm
<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>	Bastonete	3–10 μm	Ponta de lança	magnetita	Múltiplas cadeias	110–150 nm
<i>Ca. Magnetoovum mohavensis</i> cepa LO-1	ovoide	3,5 μm	Ponta de lança	magnetita	Múltiplas cadeias	151 nm
<i>Ca. Thermomagnetovibrio paiutensis</i> cepa HSMV-1	Vibrião	1,8 μm	Ponta de lança	magnetita	Cadeia única	113 nm
<i>Magnetoco-</i>	coco	2 - 3 μm	Ponta de	magnetita	Cadeia única	110 nm

<i>ccus</i> sp. cepa MHB-1			lança			
<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> cepa CS-4	ovoide	Não determinado	Ponta de lança	magnetita	Múltiplas cadeias	Não determinado
<i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> cepa HCH-1	coco	Não determinado	Ponta de lança	magnetita	Não determinado	Não determinado
<i>Nitrospirae</i> não-cultivado cepa MWB-1	ovoide	2,8 µm	Ponta de lança	magnetita	Múltiplas cadeias	116 nm

Apesar de não ter sido realizada a microanálise de raios X para identificação do mineral que compõe os magnetossomos, o aspecto dessas estruturas em relação ao padrão homogêneo de contraste ao longo da estrutura sugere que são formados por magnetita. Uma vez que magnetossomos de greigita em geral possuem menos contraste e contraste heterogêneo em relação ao contraste em toda estrutura quando observados por microscopia eletrônica de transmissão convencional (Figura 19). Provavelmente, devido à grande espessura da célula não foi possível realizar a microanálise de raios X nas amostras de bactérias magnetotáticas ovoides depositadas na grade de microscopia revestida com filme de formvar e carbono. A análise dos magnetossomos é realizada em espécimes espessos, como nos procariotos multicelulares magnetotáticos (Abreu *et al.*, 2007) e nos flagelados magnetotáticos (Leão *et al.*, 2019) quando essas células apresentam regiões menos espessas contendo os magnetossomos ou quando as células são lisadas após tratamento com água destilada ou simplesmente por ter uma estrutura frágil que é danificada durante o preparo de amostras. No entanto, nenhum desses eventos possibilitou a observação de regiões menos espessas na célula ovoide, o que demonstra sua grande resistência ao processo de preparo de amostra. Novas amostras estão em processamento para microscopia eletrônica de transmissão, em que, após o processamento, o espécime será seccionado em cortes ultrafinos de 60 nm e observados por microscopia eletrônica de transmissão.

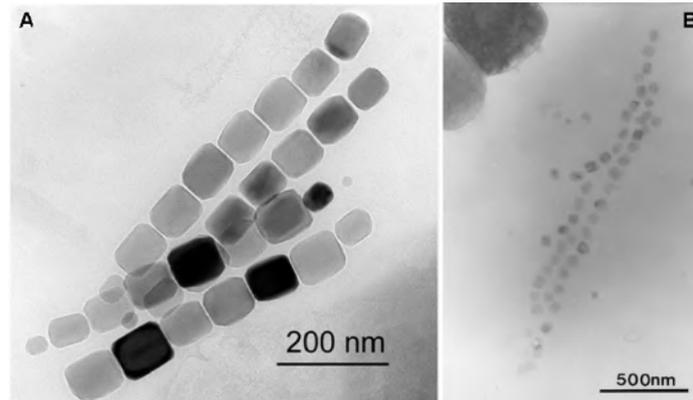


Figura 19. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de magnetossomos de magnetita e greigita. **A.** Microscopia eletrônica de transmissão em grande aumento de cadeias de magnetossomos de magnetita de morfologia prismática de cocos de água doce. Barra de escala referente a 200 nm. (Pósfai *et al.*, 2013). **B.** Microscopia eletrônica de transmissão de magnetossomos de greigita (setas) na espécie *Ca. Magnetoglobus multicellularis*. O asterisco mostra a cápsula que envolve as células do microrganismo (Lefèvre *et al.*, 2011b). Note a diferença no padrão de contraste ao longo dos magnetossomos formado por magnetita (A) e greigita (B), sendo esse mais homogêneo no caso da magnetita, enquanto que possui certa inconstância nos cristais de greigita (B).

Considerando a análise dos genes de biomineralização realizadas nesse trabalho, podemos concluir que o cenário exclusivo de origem monofilética da magnetotaxia, na qual o ancestral comum ao domínio Bacteria seria magnetotático e que eventos de perda de genes geraram o cenário atual da distribuição dessa característica, não é sustentado. A análise filogenética do gene que codifica o rRNA 16S e os genes de biomineralização não é congruente, como foi observado em Lefèvre *et al.* (2010). Além dos genes *mam*, as espécies pertencentes ao filo *Nitrospirae* conhecidas possuem genes *mad* conservados comuns a Deltaproteobacteria (Lefèvre e Bazylinski, 2013; Lefèvre *et al.*, 2013a), que também foram encontrados no ovoide estudado.

A evolução da magnetotaxia ainda é um tópico em aberta discussão entre os pesquisadores que estudam bactérias magnetotáticas, divergindo opiniões. Como foi mencionado na justificativa desta monografia, o filo *Nitrospirae* é uma linhagem ancestral antiga no domínio Bacteria (Kolinko *et al.*, 2016). A hipótese mais recente levantada sobre a evolução das bactérias magnetotáticas envolve a coexistência entre a origem monofilética, duplicação e divergência de genes, bem como a transferência horizontal de genes (Lin *et al.*, 2018). Os resultados da análise filogenética deste trabalho de conclusão de curso corroboram para esta hipótese, visto que as relações evolutivas obtidas a partir das análises filogenéticas do gene que codifica o rRNA 16S e de certas proteínas Mam são diferentes (Figura 20),

indicando uma possível transferência horizontal de alguns genes de magnetotaxia, sem excluir a hipótese da evolução monofilética. Esta hipótese também foi abordada na discussão do trabalho de Kolinko e colaboradores (2016) ao encontrar as mesmas contradições evolutivas vistas neste trabalho (Figura 20).

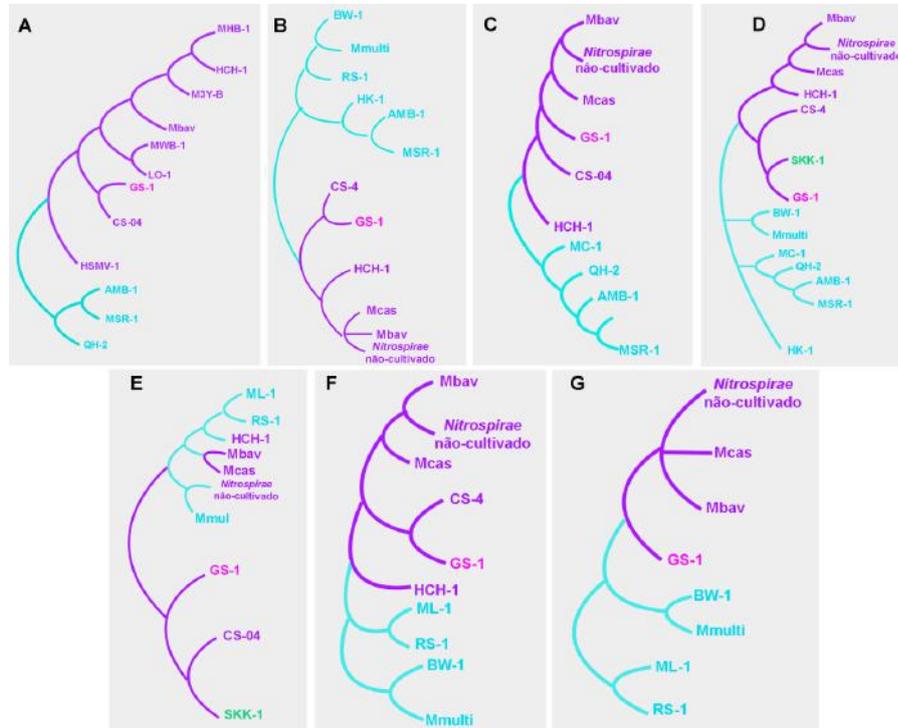


Figura 20. Ilustração resumindo as relações filogenéticas da espécie em estudo com outras bactérias magnetotáticas dos filos Nitrospirae e Proteobacteria. **A.** Ilustração referente à árvore filogenética baseada no gene que codifica o rRNA 16s. **B.** Ilustração referente à árvore filogenética baseada na proteína MamA. **C.** Ilustração referente à árvore filogenética baseada na proteína MamB. **D.** Ilustração referente à árvore filogenética baseada na proteína MamE. **E.** Ilustração referente à árvore filogenética baseada na proteína MamK. **F.** Ilustração referente à árvore filogenética baseada na proteína MamP. **G.** Ilustração referente à árvore filogenética baseada na proteína MamQ. Roxo indica bactérias magnetotáticas pertencentes ao filo *Nitrospirae*. Azul indica espécies pertencentes ao filo *Proteobacteria*. Verde indica o único representante do filo *Omnitrophica*. Rosa é a espécie em estudo. GS-1: espécie em estudo; BW-1: *Desulfamplus magnetovallimortis* cepa BW-1; HCH-1: *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1; CS-04: *Ca. Magnetoovum chiemensis* cepa CS-04. Mbav: *Ca. Magnetobacterium bavaricum*; *Ca. Magnetobacterium casensis*; SKK-1: *Ca. Omnitrophicus magneticus* cepa SKK-1; MWB-1: *Nitrospirae* não-cultivado cepa MWB-1; MHB-1: *Magnetococcus* sp. cepa MHB-1; HSMV-1: *Ca. Thermomagnetovibrio paiutensis* cepa HSMV-1; MY3-B: *Nitrospirae* não-cultivado cepa MY3-B; LO-1: *Ca. Magnetoovum mohavensis* cepa LO-1; Mmulti: *Ca. Magnetoglobus multicellularis*; MSR-1: *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1; AMB-1: *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1; ML-1: Deltaproteobacteria cepa ML-1; RS-1: *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1; *Magnetospira* sp. cepa QH-2; *Ca. Magnetomorum* sp. cepa HK-1; MC-1: *Magnetococcus marinus* cepa MC-1.

Outro aspecto interessante é que o filo *Nitrospirae* possui apenas uma classe, sendo ela Nitrospira, e apenas uma ordem, sendo esta Nitrospirales (Garrity e Holt, 2001). Os dados gerados pela árvore filogenética baseada no gene que codifica o rRNA 16S indicam a separação de bactérias magnetotáticas em dois grupos, o que futuramente em uma análise mais detalhada pode levar à descrição de classes diferentes. Logo, este estudo contribui com uma possível realocação destes táxons, já que foram descobertas novas informações sobre conteúdo genético do possível metabolismo, além das informações obtidas pelo gene que codifica o rRNA 16S. Lin e colaboradores (2018) utilizaram esta lógica para propor o remanejamento do filo Proteobacteria, ao utilizar diversos genes para propor novas divisões dentro do filo.

Além da questão evolutiva, o filo *Nitrospirae* também é conhecido pelo seu papel ambiental no ciclo do enxofre e do ferro, o que também gera interesse de estudo. Como foi visto neste trabalho, as análises por homologia de genes que codificam para enzimas-chave foram positivas para fixação de carbono e nitrogênio, e também indicam um papel no ciclo do enxofre. A fixação de carbono já foi vista no filo *Nitrospirae*, na análise do genoma da espécie *Ca. Magnetobacterium casensis*, no qual, assim como na bactéria estudada nesta monografia, foram encontradas evidências de uma possível fixação de CO₂ (Lin *et al.*, 2014). A presença desses genes indica que provavelmente a bactéria em estudo possui metabolismo autotrófico. Tal informação é extremamente relevante para a elaboração de um meio de cultivo para tentar isolar esta espécie, objetivo que nunca foi alcançado com representantes magnetotáticos do filo *Nitrospirae*. Em relação ao ciclo do nitrogênio, a enzima chave para fixação de N₂, a nitrogenase, também foi detectada, sugerindo o potencial do ovoide em questão nesse processo biológico extremamente relevante nos ecossistemas. Além disso, o potencial como fixador de nitrogênio pode auxiliar no isolamento do microrganismo em cultura axênica, bem como o potencial de fixar CO₂, uma vez que eliminaria a maior parte dos microrganismos contaminantes. Por possivelmente fixar nitrogênio e carbono, a caracterização desta nova espécie mostra o papel das bactérias magnetotáticas como produtoras primárias, já que seriam microrganismos autotróficos com potencial de fixar N₂. Em relação a participação no ciclo do enxofre, a detecção do gene que codifica a enzimas sulfato adeniltransferase, envolvida na primeira etapa de formação do sulfeto de hidrogênio a partir da redução do sulfato, indica que a bactéria é anaeróbica e capaz de utilizar sulfato como acceptor final na cadeia transportadora de elétrons (respiração). Outros genes

relacionados a assimilação de enxofre pela célula também foram identificados no genoma, como mostrado nos resultados. indicando o potencial do ovoide como redutora de sulfato nesse ambiente.

As diferenças morfológicas entre a bactéria magnetotática ovoide estudada nesse trabalho, associadas à determinação da similaridade entre as sequências do gene que codifica o rRNA 16S, cujo valor com a bactéria mais próxima foi de 91%, indicam que estamos descrevendo um novo gênero e espécie. Uma vez que foi estabelecido que 97% é o percentual mínimo para considerar duas bactérias como pertencentes a mesma espécie (Amann *et al.*, 1992, Stackebrandt e Goebel, 1994) e 93% é o percentual mínimo para considerá-las do mesmo gênero (Ludwig *et al.*, 1998).

Em vista dos resultados obtidos na caracterização da bactéria magnetotática ovoide encontrada nas fontes termais de Goldstrike e do estabelecimento da nomenclatura de bactérias na condição de *Candidatus* pelo Comitê Internacional para Sistemática de Procariotos (Stackebrandt *et al.*, 2002), sugerimos o nome *Candidatus Magnetovoides thermalis* cepa GS-1 para essa espécie.

6. CONCLUSÃO

- Foi descrita a morfologia de uma nova espécie de bactéria magnetotática encontrada nas fontes termais do Deserto de Mojave, Nevada, EUA. Por microscopia de contraste interferencial diferencial foi possível identificar células de morfologia cocoide/ovoide respondendo ao campo magnético. Esta informação associada às medidas da célula de diâmetro médio e fator de forma gera como conclusão que a bactéria possui morfologia ovóide.
- Os magnetossomos observados por microscopia eletrônica de transmissão têm morfologia anisotrópica com formato de ponta de lança com comprimento médio de 102,5 nm.
- Foi observada a presença de genes *mam* organizados em cluster contendo também genes *mad* e *man*, sendo mais uma evidência da sua participação na formação de magnetossomos anisotrópicos.
- As análises filogenéticas mostraram maior proximidade com a espécie *Ca. Magnetovoides chiemensis* cepa CS-4 (91% de similaridade entre sequências que

codifica o rRNA 16S). Ambas pertencem ao filo *Nitrospirae*, porém representam diferentes gêneros e espécies.

- As análises filogenéticas do gene que codifica o rRNA 16S e das proteínas Mam mostraram incongruências em relação à história evolutiva das espécies atuais, o que reforça a hipótese da transferência horizontal de genes.
- Os dados morfológicos, genômicos e filogenéticos permitem a descrição da nova espécie, *Candidatus Magnetovoide thermalis* cepa GS-1, sendo essa uma espécie de bactéria magnetotática de morfologia ovoide capazes de sintetizar magnetossomos com morfologia ponta de lança organizados em múltiplas cadeias e provavelmente de magnetita. Análise de conteúdo de genes indica potencial para fixação de carbono e nitrogênio, além sugerir metabolismo anaeróbico baseado na redução de sulfato. As análises filogenéticas mostraram que a espécie está inserida o filo *Nitrospirae* e forma um novo gênero.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, F., Martins, J., Souza Silveira, T., Keim, C., Lins de Barros, H.G.P., Gueiros Filho, F.G. e Lins, U. (2007). “*Candidatus magnetoglobus multicellularis*”, a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 318–1322.
- Abreu, F. Cantão, M.E., Nicolás, M.F., Barcellos, F.G., Morillo, V., Almeida, L.G., do Nascimento, F.F., Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A., R de Vasconcellos, A.T. e Lins U. (2011). Common ancestry of iron oxide- and iron-sulfide-based biomineralization in magnetotactic bacteria. *ISME J.* 10, 1634-1640.
- Abreu, F., Carolina, A., Araújo, V., Leão, P., Tavares Silva, K., Marques de Carvalho, F., de Lima Cunha, O., Almeida, L.G., Geurink, C., Farina, M., Rodelli, Daniel., Jovane, L., Pellizari, V.H., Vasconcelos, A.T., Bazylinski, D.A. e Lins, U. (2016). Culture-independent characterization of novel psychrophilic magnetotactic cocci from Antarctic marine sediments. *Environ. Microbiol.* 18, 4426–4441.
- Abreu, F., Leão P., Vargas, G., Cypriano, J., Figueiredo, V., Enrich-Prast, A., Bazylinski, D.A. e Lins, U. (2018). Culture-independent characterization of a novel magnetotactic member affiliated to the *Beta* class of the *Proteobacteria* phylum from an acidic lagoon. *Environ. Microbiol.* 20, 2615–2624.
- Amann, R.I., Lin, C., Key, R., Montgomery, L. e Stahl, D.A. (1992). Diversity among fibrobacter isolates: towards a phylogenetic classification. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 23-31.
- Andrews, S. (2010). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>. Acesso em: 5 jun. 2019.
- Ali, I., Peng, C., Khan, Z.M. e Naz, I. (2017). Yield cultivation of magnetotactic bacteria and magnetosomes: A review. *J. Basic Microbiol.* 57, 643–652.
- Arakaki, A.; Matsunaga, T. e Sakagushi, T. (2002). *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 215–221.
- Araujo, A.C., Morillo, V., Cypriano, J., Teixeira, L., Leão, P., Lyra, S., Almeida, L.G., Bazylinski, D.A., Vasconcellos, A.T., Abreu, F. e Lins, U. (2016). Combined genomic and structural analyses of a cultured

- magnetotactic bacterium reveals its niche adaptation to a dynamic environment. *BMC Genomics* 17, 22-26.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, Formmsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. e Zagnitko, O.(2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9, 1–15.
- Balkwill, D.L. (1980). Magnetotactic *Spirillum*. *J. Bacteriol.* 141, 1399–1408.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Pyshkin, A.V., Alekseyev, M.A. e Pavel, P.A.(2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477.
- Bazyliński, D.A., Frankel, R.B., Heywood, B.R., Mann, S., King, J.W., Donaghay, P.L. e Hanson, A.K. (1995). Controlled biomineralization of magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) in a magnetotactic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3232–3239.
- Bazyliński D.A e Frankel, R.B. (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 217-230.
- Bazyliński, D.A., Williams, T.J., Lefèvre, C.T., Berg, R.J., Zhang, C.L., Bowser, S.S., Dean, A.J. e Beveridge, T.J. (2013). *Magnetococcus marinus* gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (Magnetococcaceae fam. nov., Magnetococcales ord. nov.) at the base of the Alphaproteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 801–808.
- Bellini, S. (1963). Ulteriori studi sui "batteri magnetosensibili" (Further studies on magnetosensitive bacteria). Instituto de Microbiologia, Universidade of Pavia, Itália.
- Blakemore, R.P. (1975). Magnetotactic bacteria. *Science* 190, 377–379.
- Blakemore, R.P., Frankel, R.B. e Kalmijn, A.J. (1980). South-seeking magnetotactic bacteria in the Southern Hemisphere. *Nature* 286, 384–385.
- Blakemore, R.P. (1982). Magnetotactic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 36, 217-238.
- Bolger, A. M., Lohse, M. e Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
- Chen, C., Chen, L., Yi, Y. Chen, C., Wu, L.F. e Song, T. (2016). Killing of *Staphylococcus aureus* via magnetic hyperthermia mediated by magnetotactic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2219–2226.
- Chen, Y.R., Zhang, R., Du, H.J., Pan, H.M., Zhang, W.Y., Zhou, K., Lin, J.H., Xiao, T. e Wu, L.F. (2015). A novel species of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes from Lake Yuehu in China. *Environ. Microbiol.* 17, 637–647.
- Chen, Y.R., Zhang, W., Zhou, K., Pan, H.M., Du, H.J., Xu, C., Xu, J., Pradel, N., Santine, S., Li, J., Huang, H., Pan, Y., Xiao, T. e Wu, L.F. (2016). Novel species and expanded distribution of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 218–226.
- DeLong, E.F., Frankel, R. B. e Bazyliński, D.A. (1993). Multiple Evolutionary Origins of Magnetotaxis in Bacteria. *Science* 259, 803-806.
- Descamps, E.C.T., Monteil, C.L., Menguy, N., Ginet, N., Pignol, D., Bazyliński, D.A. e Lefèvre, C.T. (2017). *Syst. Appl. Microbiol.* 40, 280-289.
- Dziuba, M., Koziava, V., Grouzdev, D., Burganskaya, Baslerov, R., Kolganova, T., Chernyadyev, A., Osipov, G., Adrianova, E., Gorlenko, V. e Kuznetsov, B. (2016). *Magnetospirillum caucaseum* sp. Nov., *Magnetospirillum marisnigri* sp. Nov. and *Magnetospirillum moscoviense* sp. Nov., freshwater magnetotactic bacteria isolated from three distinct geographical locations in European Russia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 2069–2077.
- Faivre, D. e Schüler, D. (2008). Magnetotactic Bacteria and magnetosomes. *Chem. Ver.* 108, 4875–4898.
- Faivre, D. e Godec, T.U. (2015). From Bacteria to Mollusks : The Principles Underlying the Biomineralization of Iron Oxide Materials. *Angewandte Reviews* 54, 4728–4747.

- Flies, C.B., Peplies, J., Schüler, D. (2005). Combined Approach for Characterization of Uncultivated Magnetotactic Bacteria from Various Aquatic Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2723-2731.
- Frankel, R.P., Blakemore, R.P. e Wolfe, R.S. (1979). Magnetite in Freshwater Magnetotactic Bacteria. *Science* 203. 1355-1356.
- Frankel, R.B. e Blakemore, R.P. (1980). Navigational compass in magnetotactic bacteria. *J. Magn. and Magn. Mater.* 15-18, 1562-1564.
- Frankel, R.B., Papaefthymiou, G.C., Blakemore, R.P. e O'Brian, W. (1983). Fe₃O₄ precipitation in magnetotactic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 763, 147-159.
- Gadd, G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609–643.
- Gilbert, P.U.P.A., Abrecht, M., Frazer e B.F. (2005). The Organic-Mineral Interface in Biominerals. *Rev. Mineral. Geochem.* 59, 157–185.
- Gorby Y.A., Beveridge T.J. e Blakemore R.P. (1988). Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* 170, 834–841
- Gorlenko, V.M., Dzyuba, M.V., Maleeva, A.N., Panteleeva, A.N., Kolganova, T.V. e Kuznetsov, B.B. (2011). *Magnetospirillum berrantis* sp. nov., a new freshwater bacterium with magnetic inclusions, *Microbiology* 80, 692–702.
- Greene S.E. e Komeili A. (2012). Biogenesis and subcellular organization of the magnetosome organelles of magnetotactic bacteria. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 490–495.
- Grouzdev, D.S., Dziuba, M.V., Sukhacheva, M.S. Mardanov, A.V., Beletskiy, A.V., Kuznetsov, B.B. e Skryabin, K.G. (2014). Draft Genome Sequence of *Magnetospirillum* sp. Strain SO-1, a Freshwater Magnetotactic Bacterium Isolated from the Ol'khovka. *Genome Announc.* 2, e00235-14
- Grünberg, K., Wawer, C. e Tebo, B.M. (2001). A Large Gene Cluster Encoding Several Magnetosome Proteins Is Conserved in Different Species of Magnetotactic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4573–4582.
- Ji, B., Zhang, S., Arnoux, P., Alberto, F., Philippe, N., Murat, D., Zhang, W., Rioux, J.B., Ginet, N., Sabaty, M., Mangenot, S., Pradel, N., Tian, J., Yang, J., Zhang, L., Zhang, W., Pan, H., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Li, Y., Xiao, T., Médigue, C., Barbe, V., Pignol, D., Talla, E. e Wu, L.F. (2014). Comparative genomic analysis provides insights into the evolution and niche adaptation of marine *Magnetospira* sp. QH-2 strain. *Environ. Microbiol.* 16, 525-544.
- Jogler C., Kube M., Schübbe S., Ullrich S., Teellng H., Bazylinski D.A., Reinhardt, R. e Schüler, D. (2009a). Comparative analysis of magnetosome gene clusters in magnetotactic bacteria provides further evidence for horizontal gene transfer. *Environ. Microbiol.* 11, 1267–1277.
- Jogler, C., Lin, W., Meyerdieks, A., Kube, M., Katzmann, E., Flies, C., Pan, Y., Amann, R., Reinhardt, R., Schüler, D. (2009b). Toward cloning of the magnetotactic metagenome: identification of magnetosome island gene clusters in uncultivated magnetotactic bacteria from different aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3972–3979.
- Jogler C. e Schüler, D. (2009). Genomics, Genetics, and Cell Biology of Magnetosome Formation. *Ann. Rev. Microbiol.* 63, 501–521.
- Jogler, C., Niebler, M., Lin, W., Kube, M., Wanner, G., Kolinko, S., Stief, P., Beck, A.J., de Beer, D., Petersen, N., Pan, Y., Amann, R., Reinhardt, R. e Schüler, D. (2010). Cultivation-independent characterization of “*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*” via ultrastructural, geochemical, ecological and metagenomic methods. *Environ. Microbiol.* 12, 2466–2478.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. e Thornton, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comp. Appl. Biosc.* 8, 275-282.
- Keim, C.N., Abreu, F., Lins, U., Barros, H. G.L. e Farina, M. (2004). Cell organization and ultrastructure of a magnetotactic multicellular organism. *J. Struct. Biol.* 145, 254–262.

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Kirschvink, J.L. (1980). South-seeking magnetic bacteria. *J. Exp. Biol.* 86, 345-347.
- Koch, H., Lückner, S., Albertsen, M., Kitzinger, K., Herbold, C., Spieck, E., Nielsen, P.H., Wagner, M. e Daims, H. (2015). Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 11371–11376
- Kolinko, S., Richter, M., Glöckner, F.O., Brachmann, A. e Schüler D. (2016). Single-cell genomics of uncultivated deep-branching magnetotactic bacteria reveals a conserved set of magnetosome genes. *Environ. Microbiol.* 18, 21–37.
- Komeili, A. (2012). Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 1, 32–255.
- Kumar, S., Stecher, G. e Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.
- Le, S.Q. e Gascuel, O. (2008). Na Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307-1320.
- Leão, P. (2018). Diversidade de microrganismos magnetotáticos: novas fronteiras da evolução da magnetotaxia. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 87f.
- Leão, P., Le Nagard, L., Yuan, H., Cypriano, J., Da Silva-Neto, I., Bazylnski, D.A., Acosta-Avalos, D., de Barros, H.L., Hitchcock, A.P., Lins, U., Abreu, F. (2019). Magnetosome magnetite biomineralization in a flagellated protist: evidence for an early evolutionary origin for magnetoreception in eukaryotes?. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.14711.
- Lefèvre, C.T., Bernadac, A., Yu-Zhang, K., Pradel, N. e Wu, L.F. (2009). Isolation and characterization of a magnetotactic bacterial culture from the Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol.* 11, 1646–1657.
- Lefèvre, C.T., Abreu, F., Schmidt, M.L., Lins, U., Frankel, R.B., Hedlund, B.P. e Bazylnski, D.A. (2010). Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3740–3743.
- Lefèvre, C.T., Frankel, R.B., Pósfai, M., Prozorov, T. e Bazylnski, D.A. (2011a). Isolation of obligately alkaliphilic magnetotactic bacteria from extremely alkaline environments. *Environ. Microbiol.* 13, 2342-2350.
- Lefèvre, C.T., Menguy, N., Abreu, F., Lins, U., Pósfai, M., Prozorov, T., Pignol, D., Frankel, R.B. e Bazylnski, D.A. (2011b). A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria. *Science* 334, 1720–1723.
- Lefèvre, C.T., Frankel R.B., Abreu, F., Lins, U. e Bazylnski, D.A. (2011c). Culture-independent characterization of a novel, uncultivated magnetotactic member of the *Nitrospirae* phylum. *Environ. Microbiol.* 13, 538–549.
- Lefèvre, C.T., Pósfai, M., Abreu, F., Lins, U., Frankel, R.B. e Bazylnski, D.A. (2011d). Morphological features of elongated-anisotropic magnetosome crystals in magnetotactic bacteria of the *Nitrospirae* phylum and the Deltaproteobacteria class. *Earth Planet. Sci. Lett.* 312, 194–200.
- Lefèvre, C.T., Abreu, F. e Bazylnski, D.A. (2011e). A Bacterial Backbone : Magnetosomes in Magnetotactic Bacteria. In: *Metal Nanoparticles in Microbiology*. Rai, M. e Duran, N., eds. (Berlim, Springer), pp. 75-102.
- Lefèvre, C.T., Schmidt, M.L., Vitoria, N., Trubitsyn, D., Schüler, D. e Bazylnski, D.A. (2012). Insight into the evolution of magnetotaxis in *Magnetospirillum* spp., based on mam gene phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7238–7248.
- Lefèvre, C.T., Trubitsyn, D., Abreu, F., Kolinko, S., Jogler, C., de Almeida, L.G.P., de Vasconcellos, A.T.R., Kube, M., Reinhardt, R., Lins, U., Pignol, D., Schüler, D., Bazylnski, D.A. e Ginet, N. (2013a). Comparative genomic analysis of magnetotactic bacteria from the Deltaproteobacteria provides new insights into magnetite and greigite magnetosome genes required for magnetotaxis. *Environ. Microbiol.* 15, 2712–2735.

- Lefèvre, C.T., Trubitsyn, D., Abreu, F., Kolinko, S., de Almeida, L.G.P., Lins, U., Schüler, D., Ginet, N., Pignol, D. e Bazylinski, D.A. (2013b). Monophyletic origin of magnetotaxis and the first magnetosomes. *Environ. Microbiol.* 15, 2267–2274.
- Lefèvre, C.T. e Wu, L.F. (2013c). Evolution of the bacterial organelle responsible for magnetotaxis. *Trends Microbiol.* 21, 534–543.
- Lefèvre, C.T. e Bazylinski, D.A. (2013d). Ecology, Diversity, and Evolution of Magnetotactic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 497–526.
- Lower, B.H. e Bazylinski, D.A. (2013). The bacterial magnetosome: A unique prokaryotic organelle. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 23, 63–80.
- Lin, W., Jogler, C., Schüler, D. e Pan, Y. (2011). Metagenomic analysis reveals unexpected subgenomic diversity of magnetotactic bacteria within the phylum nitrospirae. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 323–326
- Lin, W., Wang, Y., Li, B. e Pan, Y. (2012). A biogeographic distribution of magnetotactic bacteria influenced by salinity. *ISME Journal* 6, 475–479.
- Lin, W., Deng, A., Wang, Z., Li, Y., Wen, T., Wu, L.F., Wu, M. e Pan, Y. (2014). Genomic insights into the uncultured genus “*Candidatus Magnetobacterium*” in the phylum *Nitrospirae*. *ISME Journal* 8, 2463–2477.
- Lin W. e Pan Y. (2015). A putative greigite-type magnetosomes gene cluster from the candidate phylum Latescibacteria. *Environ. Microbiol.* 7, 27–242.
- Lin, W., Paterson, G.A., Zhu, Q., Wang, Y., Kopylove, E., Li, Yi., Knight, R., Bazylinski, D.A., Zhu, R., Kirschvink, J.L. e Pan, Y. (2017a). Origin of microbial biomineralization and magnetotaxis during the Archean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 2171–2176.
- Lin, W., Pan, Y. e Bazylinski, D.A. (2017b). Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria. *Environ. Microbiol.* 9, 345–356.
- Lin, W., Zhang, W., Zhao, X., Roberts, A.P., Paterson, G.A., Bazylinski, D.A. e Pan, Y. (2018). Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. *ISME Journal* 12, 1508–1519.
- Lins, U. e Farina, M. (1999). Organization of cells in magnetotactic multicellular aggregates. *Microbiol. Res.* 154, 9–13.
- Lins, U., Freitas F., Keim, C.N., Lins De Barros H., Esquivel, D.M.S, e Farina, M. (2003). Simplehomemade apparatus for harvesting uncultured magnetotactic microorganisms. *Braz J Microbiol.* 34, 111–116.
- Mann, S., Sparks, N.H.C., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A. e Jannasch, H.W. (1990). Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature* 343, 258–261.
- Martel, S. (2017). Targeting active cancer cells with smart bullets. *Ther. Deliv.* 8, 301–312.
- Matsunaga, T., Okamura, Y., Fukuda, Y., Wahyudi, A.T., Murase, Y. e Takeyema, H. (2005). Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *DNA Res.* 12, 157–166.
- Morillo, V., Abreu, F., Araujo, A.C., de Almeida, L.G.P., Prast, A.E., Farina, M., de Vasconcellos, A.T.R., Bazylinski, D.A. e Lins, U. (2014). Isolation, cultivation and genomic analysis of magnetosome biomineralization genes of a new genus of South-seeking magnetotactic cocci within the Alphaproteobacteria. *Front. Microbiol.* 5, 1–12.
- Morillo, V. (2014). Isolamento, cultivo e análise genômica de *Magnetofaba australis* cepa IT-1, um novo gênero de bactéria magnetotática isolada do hemisfério Sul. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 139f.
- Moench, T.T. e Konnetzka, W.A. (1978). A novel method for the isolation and study of a magnetotactic bacterium. *Arch. Microbiol.* 119, 203–212.
- Murat, D., Quinlan, A., Vali, H. e Komeili, A. (2010). Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 5593–5598.

- Nakazawa, H., Arakaki, A., Yamada, S.N., Yashiro, I., Jinno, K., Aoki, N., Tsuruyama, A., Okamura, Y., Tanikawa, S., Fujita, N., Takeyama, H. e Matsunaga, T. (2009). Whole genome sequence of *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 revealed common gene clusters in magnetotactic bacteria. *Genome Res.* 19, 1801– 1808.
- Ostell, J.M. e Kans, J.A. (1998). The NCBI data model. *Methods Biochem. Anal.* 39, 121-144.
- Pettermann, H e Bleil, U. (1993). Detection of live magnetotactic bacteria in South Atlantic deep- sea sediments. *Earth Planet. Sci. Lett.* 117, 223-228.
- Rahn-Lee, L. e Komeili, A. (2013). The magnetosome model: insights into the mechanisms of bacterial biomineralization. *Front. Microbiol.* 4, 1-8.
- Raschdorf, O., Müller, F.D., Pósfai, M.; Plitzko, J.M. & Schüler, D. (2013) The magnetosome proteins MamX, MamZ and MamH are involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Mol. Microbiol.* 89, 872-886.
- Raschdorf, O., Forstner, Y., Kolinko, I., Uebe, R., Plitzko, J.M. e Schüler, D. (2016). Genetic and ultrastructural analysis reveals the key players and initial steps of bacterial magnetosome membrane biogenesis. *PLoS Genet.* 12, e1006101.
- Richter, M., Kube, M., Bazylini, D., Lombardot, T., Glöckner, F.O., Teinhardt, R. e Schüler, D. (2007). Comparative Genome Analysis of Four Magnetotactic Bacteria Reveals a Complex set of Group-Specific Genes Implicated in Magnetosome Biomineralization and Function. *J. Bacteriol.* 189, 4899-4910.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B.K., Gies, E.A., Dodsworth, J.A., Hedlund, B.P., Tsiamis, G., Sievert, S.M., Liu, W.T., Eisen, J.A., Hallam, S.J., Kyrpides, N.C., Stepanauskas, R., Rubin, E.M., Hugenholtz, P. e Woyke, T. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499, 431–437.
- Rioux, J. B., Philippe, N., Pereira, S., Pignol, D., Wu, L. F., e Ginet, N. (2010). A second actin-like MamK protein in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 encoded outside the genomic magnetosome island. *PLoS One* 5, e9151.
- Sakagushi, T., Arakaki, A. e Matsunaga, T. (2002). *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 215–221.
- Schübbe, S., Kube, M., Scheffel, A., Wawer, C.; Heyen, U.; Meyerdierks, A.; Madkour, M.H., Mayer, F., Reinhardt, R. e Schüler, D. (2003). Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *J. Bacteriol.* 185, 5779-5790.
- Schübbe S, Williams T.J., Xie G., Kiss H.E., Brettin T.S., Martinez D., Ross, C.A., Schüler, D., Cox, B.L., Neilson, K.H. e Bazylini, D.A. (2009). Complete genome sequence of the chemolithoautotrophic marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4835–4852.
- Schüler, D. e Frankel, R.B. (1999). Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 464-473.
- Schwarz, R. e Dayhoff, M. Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff M., editor, *Advances in Microbiology.* 4, 353-358.
- Shimoshige, H., Nakajima, Y., Kobayashi, H., Yanagisawa, K., Nagaoka, Y., Shimamura, S., Mizuki, T., Inoue, A. e Maekawa, T. (2017). Formation of core-shell nanoparticles composed of magnetite and samarium oxide in *Magnetospirillum magneticum* strain RSS-1. *PLoS ONE* 12, e0170932.
- Smalley, M.D., Marinov, G.K., Bertani, L.E. e DeSalvo, G. (2015). Genome Sequence of *Magnetospirillum magnetotacticum* Strain MS-1. *Genome Announc.* 3, e00233-15.
- Spring, S., Lins, U., Amann, R., Schleifer, K.H., Ferreira, L.C., Esquivel, D.M. e Farina, M. (1998). Phylogenetic affiliation and ultrastructure of uncultured magnetic bacteria with unusually large magnetosomes. *Arch. Microbiol.* 169, 136-147.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, A.D., Ka, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Swings, J., Tru, H.G., Ward, A.C. e Whitman, W.B. (2002). TAXONOMIC Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. 52, 1043–1047.

- Torres de Araujo, F.F., Germano, F.A., Gonçalves, L.L., Pires, M.A. e Frankel, R.B. (1990). Magnetic polarity fractions in magnetotactic bacterial population near the geomagnetic equator. *Biophys. J.* 58, 549-555.
- Uebe, R., Junge, K., Henn, V., Poxleitner, G., Katzmann, E., Plitzko, J.M., Zarivach, R., Kasama, T., Wanner, G., Pósfai, M., Böttgler, M., Matzanke, B. e Schüler, D. (2011). The cation diffusion facilitator proteins MamB and MamM of *Magnetospirillum gryphiswaldense* have distinct and complex functions, and are involved in magnetite biomineralization and magnetosome membrane assembly. *Mol. Microbiol.* 82, 818-835.
- Uebe, R. e Schüler, D. (2016). Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 14, 621–637.
- Vali, H., Förster, O., Amaratidis, G. e Petersen, N. (1987). Magnetotactic bacteria and their magnetofossils in sediments. *Earth Planet. Sci. Lett.* 86, 389-426.
- Vargas, G., Cypriano, J., Correa, T., Leão, P., Bazylinski, D.A. e Abreu, F. (2018). Applications of magnetotactic bacteria, magnetosomes and magnetosome crystals in biotechnology and nanotechnology: mini-review. *Molecules* 23, 1-25.
- Wang, L. e Nilsen-Hamilton, M. (2013). Biomineralization proteins: from vertebrates to bacteria. *Front. Biol.* 8, 234-246.
- Wang, Y., Lin, W., Li, J., e Pan, Y. (2013). High diversity of magnetotactic Deltaproteobacteria in a freshwater niche. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2813-2817.
- Wang, X., Zhang, S., Chen, P., Liu, H., Yin, H., Li, H., Xu, J., Hu, J., Liu, L., Li, L., Wang, X., Zhang, H., Jiang, W., Tian, J., Li, Y., Li, J., Widdel, F., Bak, F., Wang, X., Wang, Q., Zhang, W., Wang, Y., Li, L., Wen, T., Zhang, T., Zhang, Y., Xu, J., Hu, J., Li, S., Liu, L., Liu, J., Jiang, W., Tian, J., Li, Y., Wang, L. e Li, J. (2014). Complete Genome Sequence of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Genome Announc.* 2, 2–3.
- Wenter, R., Wanner, G., Schüler, D. e Overmann, J. (2009). Ultrastructure, tactic behaviour and potential for sulfate reduction of a novel multicellular magnetotactic prokaryote from North Sea sediments. *Environ. Microbiol.* 11, 1493–1505.
- Whelan, S. e Goldsman, N. (2001). A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 18, 691-699.
- Williams, T.J., Lefèvre, C.T., Zhao, W., Beveridge, T.J. e Bazylinski, D.A. (2012). *Magnetospira thiophila* gen. nov., sp. nov., a marine magnetotactic bacterium that represents a novel lineage within the Rhodospirillaceae (Alphaproteobacteria). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2443–2450.
- Wolf, Y. I. e Koonin, E. V. (2012). A Tight Link between Orthologs and Bidirectional Best Hits in. *Genome Biol. Evol.* 4, 1286–1294.
- Wolfe, R.S., Thauer, R.K., Pfenning, N. (1987). A ‘capillary racetrack’ method for isolation of magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 45, 31-35.
- Yamamoto, D., Taoka, A., Uchihashi, T., Sasaki, H., Watanabe, H., Ando, T. e Fukumori, Y. (2010). Visualization and structural analysis of the bacterial magnetic organelle magnetosome using atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 107, 9382–9387.
- Yang, Z. (1994). Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. *J. Mol. Evol.* 39, 306-314.
- Zeytuni, N., Ozyamak, E., Ben-Harush, B., Davidov, G., Levin, M., Gat, Y., Moyal, T., Brik, A., Komeili, A. e Zarivach, R. (2011). Self-recognition mechanism of MamA, a magnetosome-associated TPR-containing protein, promotes complex assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 480-487.
- Zhou, K., Zhang, W., Zhang, K.Y., Pan, H., Zhang, S.D., Zhang, W.J., Yue, H.D., Ying, L., Xiao, T. e Wu, L.F. (2012). *Environ. Microbiol.* 14, 405-413.
- Zhu, K., Pan, H., Li, J., Zhang, K.Y., Zhang, S.D., Zhang, W.Y., Zhou, K., Yue, H., Pan, Y., Xiao, T. e Wu, L.F. (2010). Isolation and characterization of a marine magnetotactic spirillum axenic culture QH-2 from an intertidal zone of the China Sea. *Res. Microbiol.* 161, 276-283.