

LUCAS MENDES DIAS

Estudo morfológico, ultraestrutural e filogenético de um organismo magnetotático encontrado no rio Ururaí por técnicas independentes de cultivo



Monografia apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como 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 do Professor Pedro Leão**

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

M538e Mendes Dias, Lucas Dias Mendes
Estudo morfológico, ultraestrutural e filogenético de um organismo magnetotático encontrado no rio Ururá por técnicas independentes de cultivo / Lucas Dias Mendes Mendes Dias. -- Rio de Janeiro, 2019.
29 f.

Orientador: Pedro Leão.
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. Nitrospirae. I. Leão, Pedro, 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: **Lucas Mendes Dias**
DRE: 114047675

BANCA EXAMINADORA: Profa. Fernanda de Ávila Abreu (Presidente)
Mestre Amanda Vieira Araújo
Dr. Fernando Pereira de Almeida
Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: **“Estudo morfológico, ultraestrutural e filogenético de um organismo magnetotático encontrado no rio Ururá por técnicas independentes de cultivo”**

Local: **Sala de Reuniões do Departamento de Microbiologia Geral / CCS / UFRJ**
Data e hora de início: **03 de julho de 2019 às 10:00h**

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 9,1 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 (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 03 de julho de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>8,5</u>	<u>Fernanda de Ávila Abreu</u> Profa. Fernanda de Ávila Abreu
<u>9,2</u>	<u>Amanda Vieira Araújo Alves</u> Mestre Amanda Vieira Araújo
<u>9,5</u>	<u>Fernando P. de Almeida</u> Dr. Fernando Pereira de Almeida
	<u>Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius</u> Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius
Aluno:	<u>Lucas Mendes Dias</u> Lucas Mendes Dias
Orientador:	<u>Prof. Pedro Ernesto Lopes Leão</u> Prof. Pedro Ernesto Lopes Leão
Coordenador de TCC	<u>Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade da vida;

À minha mãe, Josiane, que sempre me apoiou mesmo com todas as dificuldades;

Ao meu pai, Ricardo, que com seus exemplos consegui ser o homem que sou;

Aos demais membros da minha família, por toda a ajuda e por sempre acreditarem em mim;

Ao professor Pedro Leão por sua dedicação e paciência em me orientar;

Aos amigos de laboratório, que sempre estavam dispostos a ajudar ou a ensinar algo novo;

Aos membros da banca, por aceitarem prontamente fazer parte de minha banca de defesa.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes;

As agências de fomento CNPQ, CAPES E FAPERJ pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

LUCAS MENDES DIAS

ESTUDO MORFOLÓGICO, ULTRAESTRUTURAL E FILOGENÉTICO DE UM ORGANISMO MAGNETOTÁTICO ENCONTRADO NO RIO URURAIÍ POR TÉCNICAS INDEPENDENTES DE CULTIVO

Orientador: Pedro Leão

Microrganismos magnetotáticos são um grupo de organismos que apresentam como característica comum a produção geneticamente controlada de nanopartículas magnéticas envoltas por uma membrana biológica chamadas magnetossomos. Esses microrganismos podem ser encontrados em diversos grupos taxonômicos; podem apresentar diferentes composições da porção mineral dos magnetossomos, podendo ser de magnetita ou greigita; podem apresentar diferentes modos de organização dos magnetossomos no citoplasma celular e diferentes genes envolvidos na síntese dessas nanopartículas. Apesar dos avanços recentes envolvendo o estudo de microrganismos magnetotáticos por técnicas independentes de cultivo, grande parte das informações que temos sobre os magnetossomos e sua relação com os organismos magnetotáticos tem origem em estudos que utilizam representantes em cultura que na sua grande maioria pertencem ao filo Proteobacteria. Nesse trabalho, foi observada a predominância de microrganismos magnetotáticos apresentando cristais anisotrópicos nas amostras coletadas no rio Ururaí. Após algum tempo com as amostras acondicionadas no laboratório, ficou ainda mais evidente a predominância de bactérias magnetotáticas com morfologia arredondada comprimento médio de 4,04 μ m, largura média de 3,36 μ m, e a presença de grande quantidade de grânulos que apresentam coloração dourada na microscopia ótica e propriedades eletrólucidas em microscopia eletrônica de transmissão. Técnicas de sequenciamento do gene *rrs* e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) permitiram a identificação dessa bactéria, referida nesse trabalho como cepa NUR-1, como sendo pertencente a uma nova família da ordem Nitrospirales dentro do filo Nitrospirae. Os magnetossomos presentes nessas mesmas células apresentam morfologia anisotrópica com comprimento médio de 120nm, largura média de 41,7nm, fator de forma médio de 0,35 e distribuição em múltiplas cadeias localizadas próximas a membrana citoplasmática. Análises mais detalhadas dos magnetossomos permitiram a visualização de uma membrana circundando individualmente cada magnetossomo e a inferência de que os cristais magnéticos são de magnetita. As informações adquiridas nesse trabalho corroboram uma tendência recente que acredita que as bactérias magnetotáticas com cristais anisotrópicos, mais precisamente aquelas pertencentes ao filo Nitrospirae, podem ser as mais abundantes em amostras ambientais.

Palavras-chave: microbiologia ambiental, bactérias magnetotáticas, Nitrospirae

ABSTRACT

LUCAS MENDES DIAS

CULTURE-INDEPENDENT STUDY OF MORPHOLOGICAL, ULTRASTRUCTURAL AND PHYLOGENETIC CHARACTERISTICS OF A MAGNETOTACTIC BACTERIA FOUND IN URURAI RIVER

Advisor: Pedro Leão

Magnetotactic microorganisms are a group of organisms that present as a common featuring the genetically controlled production of magnetic nanoparticles surrounded by a biological membrane called magnetosomes. These microorganisms can be found in several taxonomic groups, they may present different compositions of their mineral portion of the magnetosomes, different ways of organizing magnetosome inside the cellular body and different genes responsible for the synthesis of these nanoparticles. Despite the recent advances in the study of magnetotactic microorganisms by culture-independent techniques, much of the information about magnetosomes and its relation with magnetotactic organisms came from studies that used bacteria in culture that in their majority belong to the phylum Proteobacteria. In this work, samples collected in Ururaí river presented the majority of magnetotactic microorganisms showing anisotropic crystals. After some time with the collected samples conditioned in the laboratory, the predominance of magnetotactic bacteria with a round morphology, mean length of 4.04 μm , mean width of 3.36 μm , and with multiples granules on the cytoplasm that seams gold under the light microscope, and electron lucent under the transmission electron microscope. A combination of rrs gene sequencing and fluorescence in situ hybridization (FISH) allowed the identification of this bacterium, referred in this work as strain NUR-1, belonging to a new family of the Nitrospirales order within the phylum Nitrospirae. NUR-1 have anisotropic magnetosomes, with an average length of 120nm, mean width of 41.7nm, and mean shape factor of 0.35. Magnetosomes are organized in multiple chains located near the cytoplasmic membrane. More detailed analyses of magnetosomes allowed the visualization of a membrane surrounding each crystal individually, and the probable composition of the magnetic crystals being of magnetite. The information acquired in this work corroborates a recent trend that believes magnetotactic bacteria with anisotropic crystals, more precisely those belonging to the phylum Nitrospirae, may be the most abundant in environmental samples.

Keywords: Environmental microbiology, magnetotactic bacteria, Nitrospirae

Sumário

1.	Introdução	1
1.1	Bactérias magnetotáticas: características gerais	1
1.2	Magnetossomos	2
1.2.1	Estrutura dos magnetossomos.....	2
1.2.2	Aspectos genéticos relacionados com magnetossomos	4
1.2.3	Formação dos magnetossomos	5
1.3	Diversidade filogenética e morfológica das bactérias magnetotáticas	7
1.3.1	Bactérias magnetotáticas do filo Nitrospirae.....	7
2.	Justificativa	10
3.	Objetivos.....	10
3.1	Objetivo geral	10
3.2	Objetivos específicos	10
4.	Metodologia.....	11
4.1	Coleta e concentração de bactérias magnetotáticas	11
4.2	Amplificação do gene rrs.....	11
4.3	Clonagem, sequenciamento e análise filogenética	12
4.4	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	12
4.5	Microscopia ótica	13
4.6	Microscopia eletrônica de transmissão.....	13
4.7	Microscopia eletrônica no modo transmissão-varredura e microanálise.....	13
4.8	Medidas e análises estatísticas.....	14
5.	Resultados	14
5.1	Bactérias magnetotáticas presentes no rio Ururáí.....	14
5.2	Classificação filogenética de bactéria magnetotática arredondada encontrada no rio Ururáí 17	
5.3	Caracterização ultraestrutural de bactérias magnetotáticas da cepa NUR-1	19
5.4	Caracterização dos magnetossomos presentes em células da cepa NUR-1.....	20
6.	Discussão	21
7.	Conclusão	23
8.	Bibliografia.....	24

Índice de figuras

Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de bactérias magnetotáticas mostrando as formas de magnetossomo de magnetita	2
Figura 2. Diversidade morfológica de bactérias magnetotáticas	4
Figura 3. Diversidade morfológica de bactérias magnetotática em amostra do rio Ururaí. 15	
Figura 4. Grande concentração de bactérias com formato arredondado nas amostras coletadas no rio Ururaí	16
Figura 5. Posicionamento filogenético e correlação da filogenia com a morfologia celular da cepa NUR-1	18
Figura 6. Análise ultraestrutural de bactérias da cepa NUR-1 por microscopia eletrônica	19
Figura 7. Análise do tamanho e do formato dos magnetossomos encontrados no interior de células da cepa NUR-1	20
Figura 8. Análise do tamanho e do formato dos magnetossomos encontrados no interior de células da cepa NUR-1	21

1. Introdução

1.1 Bactérias magnetotáticas: características gerais

As bactérias magnetotáticas são organismos capazes de responder a campos magnéticos devido à presença de nanopartículas magnéticas envoltas por uma membrana biológica que são encontradas em seu citoplasma chamadas magnetossomos (Bazylinski e Frankel, 2004). Esse grupo de bactérias foi primeiramente descoberto por Salvatore Bellini que observou que esses organismos se moviam de forma orientada em relação a um campo magnético aplicado (Bellini, 1963), chamado esse comportamento de magnetossensibilidade (Frankel, 2009). Em 1975, as bactérias magnetotáticas foram redescobertas por Richard Blakemore. Em sua publicação na revista *Science*, Blakemore relatou a presença de bactérias que nadavam de forma ordenada em relação ao campo geomagnético, além de observar pela primeira vez por microscopia eletrônica de transmissão os magnetossomos (Blakemore, 1975).

O fenômeno de motilidade flagelar associada ao alinhamento das bactérias às linhas do campo magnético observado por Blakemore foi chamado de magnetotaxia (Blakemore, 1975). Esse comportamento permite as bactérias magnetotáticas utilizarem o campo magnético da Terra como guia para se deslocar de forma mais eficiente por gradientes químicos verticais presentes na coluna d'água ou no sedimento (Frankel *et al.*, 1997).

Atualmente sabe-se que além da produção de magnetossomo, as bactérias magnetotáticas apresentam como características em comum: estrutura de parede celular correspondente a bactérias Gram-negativas; apresentar metabolismo sensível ao oxigênio, podendo ser tanto microaerófilas como anaeróbias; serem encontradas na coluna d'água ou nos primeiros centímetros da camada do sedimento em ambientes tanto de água doce quanto água salgada (Bazylinski e Frankel, 2004), sendo também relatada sua presença em solos alagados (Fassbinder, Stanjek e Vali, 1990). Bactérias magnetotáticas já foram encontradas em ambiente mesofílicos, mas também em ambientes alcalinos (Bazylinski e Lefèvre 2013), ácidos (Abreu *et al.*, 2018), com altas concentrações de sal (Abreu *et al.*, 2007; Lefèvre, 2012), temperaturas mais elevadas (Lefèvre *et al.*, 2010) e baixas temperaturas (Abreu *et al.*, 2016).

1.2 Magnetossomos

Os magnetossomos são a assinatura estrutural das bactérias magnetotáticas. Duas porções compõem os magnetossomos, uma porção mineral representada pelo cristal magnético, e uma porção biológica composta de uma bicamada lipídica rica em proteínas específicas (Peigneux *et al.*, 2016). O processo de formação dessas estruturas é classificado como uma biomineralização biologicamente controlada (BBC), uma vez que genes específicos presentes no cromossomo bacteriano são responsáveis pela sua confecção (Lowestam e Weiner, 1989; Schueler, 2008).

1.2.1 Estrutura dos magnetossomos

O cristal magnético do magnetossomo pode ter seu tamanho variando entre 35 e 120 nm e sua composição de magnetita (Fe_3O_4) ou greigita (Fe_3S_4). Dentro dessa faixa de tamanho, os magnetossomos são monodomínios magnéticos, o que garante sua máxima e permanente magnetização (Bazylinski e Frankel, 2004). Dentre os morfotipos encontrados até o momento, os cristais de magnetita podem se apresentar como cuboctaédricos, prismáticos ou em forma de ponta de lança (anisotrópicos), enquanto os magnetossomos de greigita são, geralmente, classificados como irregulares ou pleomórficos (Bazylinski e Frankel, 2004) (Figura 1).

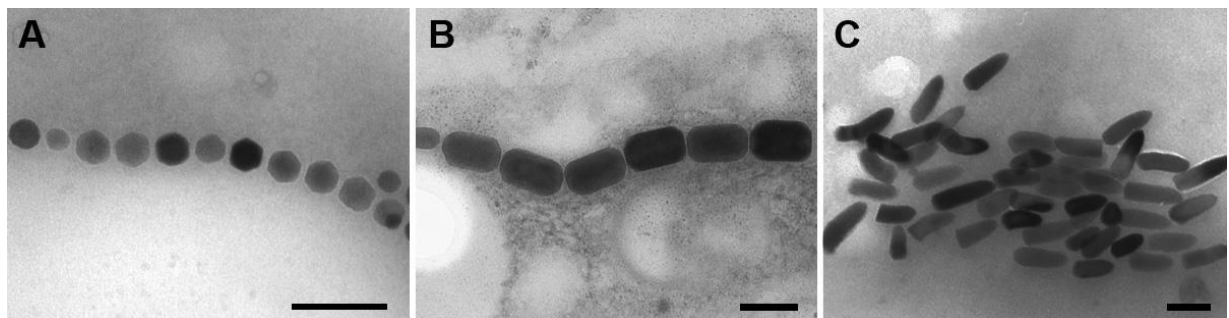


Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de bactérias magnetotáticas mostrando as formas de magnetossomo de magnetita. A) Magnetossomos cuboctaédricos produzidos por *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1 organizados em uma cadeia simples; B) Magnetossomos como morfologia prismática organizados em única cadeia observados em bactéria magnetotática não cultivada; C) Múltiplas cadeias de magnetossomos com morfologia em ponta de lança em bactéria magnetotática não cultivada. A barra de escala indica 100 nm em todas as imagens. Retirado do acervo do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia, IMPG, UFRJ.

Diferentes espécies de bactérias magnetotáticas são capazes de produzir magnetossomos de minerais ou formatos distintos. Porém na grande maioria dos casos a mesma espécie só é capaz de produzir um único tipo de magnetossomo, sendo estes classificados como espécie-específicos (Jogler e Schüler, 2009). Por outro lado, espécies diferentes podem produzir cristais com estruturas químicas e cristalográficas semelhantes.

Quatro bactérias magnetotáticas específicas já foram encontradas com magnetossomos de magnetita e greigita concomitantemente em seus citoplasmas. A primeira bactéria foi observada em amostras ambientais coletadas em Rhode Island nos EUA, sendo capaz de alinhar magnetossomos quimicamente diferentes em uma mesma cadeia (Bazylinski *et al.*, 1993). A segunda e terceira exceções são procariotos multicelulares magnetotáticos (MMPs) – do inglês Multicellular Magnetotactic Prokaryote) encontrados na lagoa Itaipu no Rio de Janeiro (Lins *et al.*, 2007) e no lago Yuehu na China (Chen *et al.*, 2015). Nesses organismos, foram identificados cristais anisotrópicos de magnetita e retangulares de greigita compondo os magnetossomos. A quarta, e mais recente exceção descoberta até o momento, é representada pela única bactéria produtora de greigita cultivada até o momento, denominada *Desulfamplus magnetovallimortis* cepa BW-1, cuja variação nas condições de cultivo pode permitir que a célula biomineralize cristais de magnetita ou greigita (Descamps *et al.*, 2017).

As espécies do gênero *Magnetospirillum* tais como: *Ms. magnetotacticum* cepa MS-1, *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1, *Ms. magneticum* cepa AMB-1, *Ms. caucaseum*, *Ms. Marisnigri* e *Ms. Moscoviense*, produzem uma única cadeia de magnetossomos de magnetita de morfologia cuboctaédrica (Pósfai, Kasama e Dunin-Borkowski, 2007; Diziuba *et al.*, 2016) (Figura 1A). Os vibriões (Figura 2A) e cocos magnetotáticos (Figura 2B) costumam apresentar cristais de magnetita com morfologia alongada, classificada como prismática ou pseudo-hexagonal-prismática (Pósfai, Kasama e Dunin-Borkowski, 2007; Williams *et al.*, 2012) (Figura 1B), como descrito para as espécies *Mv. blakemorei* cepas MV-1 (Bazylinski, Frankel e Jannasch, 1988), MV-2 e MV-4 (Meldrum *et al.* 1993a), *Magnetococcus. marinus* cepa MC-1 (Meldrum *et al.*, 1993b; Bazylinski *et al.*, 2013a), *Mf. australis* cepa IT-1 (Morillo *et al.*, 2014) e nos cocos não cultivados encontrados na China (Zhang *et al.*, 2012) e na lagoa de Itaipu (Farina *et al.*, 1994). Os cristais ponta de lança (anisotrópicos) encontrados até o momento são todos compostos de magnetita (Figura 1C), com a exceção de dois indivíduos que foram caracterizados contendo cristais anisotrópicos de greigita (Wender *et al.*, 2009 ; Posfai *et al.*, 1998). Os cristais com essa morfologia podem ser encontrados em representantes do filo Nitrospirae, como *Ca. Magnetoovum mohavensis* cepa LO-1 e *Ca. Thermomagnetovibrio paiutensis* cepa HSMV-1 (Lefèvre *et al.*, 2011c), assim como em representantes da classe *Deltaproteobacteria*, como os MMPs caracterizados até o momento (Lins *et al.* 2007; Wenter *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012) e *D. magneticus* cepa RS-1 (Sakaguchi *et al.*, 2002).

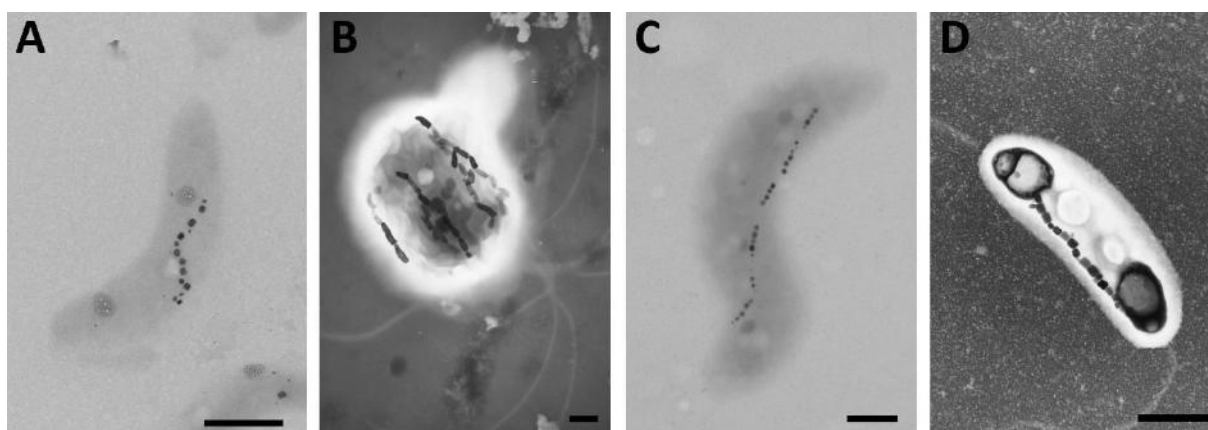


Figura 2. Diversidade morfológica de bactérias magnetotáticas. Os magnetossomos são visualizados como inclusões eletrondensas no interior das bactérias. A) Vibrião (*Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1); B) Cocos (bactéria não cultivada observada em amostra coletada do ambiente); C) Espirilo (*Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1) e D) Bacilo (bactéria não cultivada observada em amostra coletada do ambiente). Barra de escala correspondente a 1 μm em todas as imagens. Retirado do acervo do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia, IMPG, UFRJ.

1.2.2 Aspectos genéticos relacionados com magnetossomos

A biomineralização dos magnetossomos é um processo regulado a nível genético, existindo um conjunto de genes específicos que influenciam diretamente o tamanho, a forma e a composição dos magnetossomos (Bazylinski e Frankel, 2004). Dentre esses, genes das famílias *mam* (do inglês *magnetosome membrane*) e *mms* (do inglês *magnetic particle membrane specific*) estão presentes em todas as bactérias magnetotáticas analisadas até o momento (Uebe e Schüller, 2016), sendo as famílias de genes envolvidos na magnetotaxia mais estudados. Além desses, outros genes associados à biomineralização de magnetossomos também já foram descritos, sendo esses restritos a alguns grupos específicos de bactérias magnetotáticas, como os genes *mad* (do inglês *magnetosome associated Deltaproteobacteria*), descritos inicialmente em Deltaproteobactérias (Lefèvre *et al.*, 2013a), e os genes *man* (do inglês *magnetosome genes in Nitrospira*) (Lin *et al.*, 2014a). A função específica e a regulação dos genes *mad* e genes *man* ainda não foram completamente esclarecidas, principalmente pelo fato de estarem, em sua maioria, presentes em bactérias magnetotáticas não cultivadas. (Lefèvre *et al.*, 2013a; Lin *et al.*, 2017)

Em trabalhos realizados com quatro espécies de bactérias magnetotáticas pertencentes à classe Alphaproteobacteria, foram observados 28 genes especificamente relacionados com o fenótipo magnetotático (Richter *et al.*, 2007). Nas espécies dos gêneros *Magnetospirillum* e *Magnetovibrio*, grande parte dos genes responsáveis pelo processo de BBC estão organizados

em quatro *operons* (*mamAB*, *mamXY*, *mms6* e *mamGFDC*). Nesses gêneros, esses *operons* estão agrupados em uma região do genoma com características similares às ilhas genômicas presentes em cromossomos bacterianos, sendo então denominada ilha do magnetossomo (MAI – do inglês *Magnetosome Island*) (Ulrich *et al.*, 2005; Jogler *et al.*, 2009). Porém, os mesmos genes responsáveis pelo processo de biomineralização em outras espécies, como *Mc. marinus* cepa MC-1 (Schübbe *et al.*, 2009) e *Magnetospira sp.* cepa QH-2 (Ji *et al.*, 2014), não estão organizados em uma estrutura similar às das ilhas genômicas.

Análises do sequenciamento total ou parcial do genoma de bactérias magnetotáticas isoladas em cultura e provenientes de amostras ambientais levaram ao mapeamento de diversos genes responsáveis pela formação da cadeia de magnetossomos em 15 espécies bacterianas até o momento (Lefèvre e Long-Fei, 2013; Lin *et al.*, 2014b; Lin e Pan, 2015). Destas espécies, *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 são as mais estudadas devido à facilidade de cultivo e desenvolvimento de um sistema genético, servindo de modelo para a compreensão do processo de formação dos magnetossomos (Scheffel *et al.*, 2006; Murat *et al.*, 2012).

1.2.3 Formação dos magnetossomos

A produção de magnetita em bactérias magnetotáticas é um processo complexo e conta com inúmeras etapas ainda não claramente descritas. O processo de biomineralização de greigita por esses organismos é ainda menos compreendido, principalmente pela escassez de bactérias magnetotáticas produtoras de greigita cultiváveis (Uebe e Schüller, 2016; Abreu *et al.*, 2011).

O início do processo de formação dos magnetossomos se dá pelo recrutamento de proteínas específicas para uma região determinada da porção interna da membrana citoplasmática bacteriana (Komeili, 2007). Concomitantemente ao recrutamento, esta porção da membrana sofre alterações conformacionais que permitem uma invaginação em direção à porção citoplasmática da célula (Komeili *et al.*, 2006). Estudos feitos na espécie *Ms. magneticum* cepa AMB-1, mostraram que os genes que codificam as proteínas responsáveis pelo recrutamento de proteínas específicas e pela estruturação da vesícula estão presentes no operon *mamAB* (Arakaki, Webb e Matsunaga, 2003). A vesícula formada teria em sua superfície o conjunto de proteínas necessárias para iniciar o processo de biomineralização propriamente dito (Komeili *et al.*, 2004; Lohße *et al.*, 2011). Após a sua formação, a vesícula é

ancorada por proteínas presentes na sua superfície, em especial a proteína MamJ no gênero *Magnetospirillum* (Scheffel *et al.*, 2006), em um filamento proteico presente no citoesqueleto bacteriano composto predominantemente pela proteína MamK, uma proteína de estrutura similar à actina, bem caracterizada em *Ms. magneticum* cepa AMB-1, e conservada em todas as bactérias magnetotáticas identificadas até o momento (Komeili *et al.*, 2006). Esse ancoramento é fundamental para o alinhamento dos magnetossomos em cadeia no interior da célula e para um bom funcionamento do movimento magnetotático (Faivre *et al.*, 2010).

O processo de nucleação dos cristais se inicia a partir do momento em que a vesícula do magnetossomo está formada, coexistindo em uma mesma cadeia magnetossomos com diferentes graus de desenvolvimento (Komeili *et al.*, 2004). Um estudo de 2011, que utilizou a cepa MSR-1 da espécie *Ms. gryphiswaldense*, indicou que as proteínas necessárias para o início do processo de nucleação dos cristais também estão presentes no operon *mamAB*, sendo a expressão deste *operon* fundamental e suficiente para criar as condições necessárias para o início do processo de desenvolvimento da porção mineral dos magnetossomos (Lohße *et al.*, 2011). Como etapa final do processo, a maturação do magnetossomo ocorre sobre influência de proteínas situadas, tanto na membrana do magnetossomo (Murat *et al.*, 2010), quanto na própria superfície do cristal em desenvolvimento (Arakaki, Webb e Matsunaga, 2003). Um exemplo é a proteína Mms6 que auxilia no controle da morfologia dos cristais em formação, sendo vital para a síntese correta das faces cristalográficas na espécie *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (Tanaka *et al.*, 2011). A maioria dessas proteínas responsáveis pelo controle de tamanho e forma, vitais para a preservação das propriedades magnéticas destas partículas, são expressas pelos genes presentes nos outros três operons: *mms6*, *mamGFDC* e *mamXY* na espécie *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 (Scheffel *et al.*, 2008).

Ao término do processo de biomineralização, magnetossomos maduros são alinhados no citoplasma bacteriano formando uma ou múltiplas cadeias encontradas na porção central da célula alinhada longitudinalmente à mesma, na maioria dos casos. Ao se alinharem, os momentos magnéticos dos cristais se orientam de forma paralela uns aos outros na direção da cadeia (Frankel, 1984). Nesta configuração, a cadeia de magnetossomos possui um momento de dipolo magnético permanente (Frankel, 1984, Prokscha *et al.*, 1995). Ao serem somados, os momentos magnéticos de cada partícula funcionam em conjunto como uma única barra magnética com um polo sul e um polo norte, o que garante a otimização do momento magnético da célula, possibilitando a orientação do corpo celular bacteriano em relação ao campo geomagnético ou um campo aplicado (Frankel, 1984; Hanzlik, Winklhofer e Petersen, 2002).

1.3 Diversidade filogenética e morfológica das bactérias magnetotáticas

O termo bactéria magnetotática não apresenta nenhum valor filogenético, sendo esse grupo caracterizado por uma grande diversidade tanto morfológica quanto filogenética. O morfotipo de bactérias magnetotáticas observado de forma mais rotineira em coletas de amostras ambientais são cocos (Figura 2B) que se deslocam em alta velocidade (Spring e Bazylinski, 2000). No entanto, bastonetes (Figura 2D), vibriões (Figura 2A), espirilos (Figura 2C) também são facilmente observados nessas amostras (Figura 2). Com menor frequência, procariotos multicelulares magnetotáticos (MMPs) também são morfotipos frequentemente observados, na maioria das vezes em amostras provenientes do sedimento (Farina *et al.*, 1993; Abreu *et al.*, 2004; Leão *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2016).

Quanto à filogenia, as bactérias magnetotáticas estão distribuídas nos filós Nitrospirae, Proteobacteria (Bazylinski e Frankel, 2004) e no filo *Candidatus* Omnitrophica (Kolinko *et al.*, 2016). Análises de metagenômica de amostras provenientes do lago Sakinaw (Canadá) sugerem a presença de bactérias magnetotáticas pertencentes ao filo Latescibacteria, entretanto, não há dados sobre o comportamento magnetotático ou presença de magnetossomos em bactérias pertencentes a esse filo (Lin e Pan, 2015).

Apesar de serem facilmente encontradas no ambiente, poucos representantes do grupo de bactérias magnetotáticas foram isolados em cultura pura até o momento. Todas as espécies formalmente descritas, assim como grande parte das bactérias caracterizadas a nível filogenético pertencem ao filo Proteobactéria. A classe Alphaproteobacteria acumula o maior número de organismos magnetotáticos em cultura (Uebe e Schüller, 2016). Na ordem Magnetococcales são encontrados os coccus de água salgada *Magnetococcus marinus* cepa MC-1 (Bazylinski *et al.*, 2013a), *Magnetococcus massalia* cepa MO-1 (Lefèvre *et al.*, 2009) e *Magnetofaba australis* cepa IT-1 (Morillo, *et al.*, 2014). Nessa mesma classe na ordem Rhodospirillales, estão incluídos os espirilos de água doce (Figura 2C) isolados em cultura que pertencentes ao gênero *Magnetospirillum*: *Ms. magneticum* cepa AMB-1, *Ms. magnetotaticum* cepa MS-1, *Ms. gryphiswaldense* cepa MRS-1 (Williams *et al.*, 2012), *Ms. caucaseum*, *Ms. marisnigri*, *Ms. moscoviense* (Diziuba *et al.*, 2016) e *Ms. aberrantes* (Gorlenko *et al.*, 2011). As espécies marinhas cultivadas *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1 (Bazylinski *et al.*, 2013b) (Figura 1A), *Magnetospira thiophila* cepa MMS-1 (Williams *et al.*, 2012) e *Magnetospira sp.* cepa QH-2 (Ji *et al.*, 2014).

A classe Deltaproteobacteria inclui poucas bactérias magnetotáticas isoladas em cultura. Na ordem Desulfovibrionales está presente a bactéria *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1 (Sakaguchi *et al.*, 2002) que tem como característica a produção de uma outra organela rica em ferro além dos magnetossomos, denominada ferrossomo (Byrne *et al.*, 2010). Outra ordem pertencente a esta classe que apresenta bactérias magnetotáticas cultivadas é a Desulfobacterales, temos *Desulfamplus magnetovallimortis* cepa BW-1, e a cepa SS-2 como principais representantes. Nessa mesma ordem, encontram-se ainda os MMPs, descritos como um agregado de 10 a 60 células bacterianas idênticas geneticamente que se movimentam como uma unidade e apresentam um ciclo de vida inteiramente multicelular (Keim *et al.*, 2004a; Lins e Farina, 1999; Abreu *et al.*, 2006). Até o momento não foi relatado o isolamento de nenhum representante desse grupo em cultura pura. Contudo, diversos MMPs já foram caracterizados em nível molecular e ultraestrutural, sendo descritos na condição de *Candidatus*, como por exemplo: *Ca. Magnetoglobus multicellularis* (Abreu *et al.*, 2007), *Ca. Magnetomorum litorale* (Wenter *et al.*, 2009), *Ca. Magnetanas tsingtaoensis* (Zhou *et al.*, 2012), *Ca. Magnetanas rongchenensis* (Chen *et al.*, 2015; Leão *et al.*, 2018) e *Ca. Magnetanas drummondensis* (Chen *et al.*, 2016).

Ainda são poucas as bactérias magnetotáticas descritas na classe Gammaproteobacteria. Atualmente há duas cepas isoladas em cultura pura (BW-2 e SS-5) (Lefèvre *et al.*, 2013a) e algumas cepas identificadas através de análises moleculares na China (Wang *et al.*, 2013) alocados nessa classe filogenética. Contudo, pouco se sabe a respeito desses indivíduos.

Atualmente, muitos trabalhos vêm revelando que a diversidade filogenética de organismos magnetotáticos ainda é subestimada. Abreu *et al.*, 2018 realizaram, recentemente, a caracterização da primeira bactéria magnetotática pertencente a classe Betaproteobactéria, enquanto Lin *et al.*, 2018 levantaram evidências genômicas da presença de bactérias magnetotáticas nas classes Zetaproteobacteria e *Candidatus* Lambdaproteobacteria.

1.3.1 Bactérias magnetotáticas do filo Nitrospirae

Bactérias pertencentes ao filo Nitrospirae são conhecidas pela sua capacidade de realizar a oxidação do nitrito, tendo um papel fundamental no ciclo do nitrogênio, permitindo a realização da nitrificação (Koch *et al.*, 2015), existindo ainda alguns indivíduos capazes de realizar o processo de nitrificação completo, oxidando amônia a nitrato (van Kessel *et al.*, 2016). Representantes desse filo já foram encontrados em praticamente todos os ecossistemas, desde

ambientes terrestres (Pester et al., 2014) até ambientes aquáticos (Lin et al., 2014; Qian et al., 2019), locais prístinos (Jogler et al., 2010) ou com influência antropológica (Wagner et al., 2002). Até o momento, poucos representantes do filo Nitrospirae foram isolados em cultura, sendo as técnicas de enriquecimento de amostras ambientais fundamentais para o estudo desses indivíduos (Blackburne et al., 2007; Off et al., 2010). Devido a facilidade da concentração magnética dos organismos magnetotáticos, através de técnicas independentes de cultivo, foi possível a caracterização de diversas espécies de bactérias magnetotáticas pertencentes ao filo Nitrospirae. A espécie *Ca. Magnetobacterium bavaricum* foi a primeira bactéria magnetotática desse filo a ter sequências do gene que codifica o RNAr 16S recuperadas de amostras ambientais (Spring et al., 1993). Esta bactéria tem um formato de bastonete e tem como diferencial o seu grande tamanho (6 a 10µm), e o grande número de magnetossomos anisotrópicos de magnetita no seu interior (podendo chegar a mais de 1000) organizados em múltiplas cadeias condensadas no eixo longitudinal da célula (Jogler et al., 2010; Jogler et al., 2011).

Outras bactérias magnetotáticas pertencentes ao filo Nitrospirae encontradas em amostras ambientais até o momento incluem: *Ca. Magnetobacterium casensis* cepa Mcas (Lin et al., 2014a), *Ca. Thermomagnetovibrio paiutensis* cepa HSMV-1 (Lefèvre et al., 2010), *Ca. Magnetoovum mohavensis* cepa LO-1, cepa CS-4 e cepa MWB-1 (Lefèvre et al., 2011^a; Lin et al., 2014). Até pouco tempo, todos os representantes magnetotáticos desse filo apresentavam o mesmo morfotipo de bastonetes alongado, sendo a cepa LO-1 o primeiro representante desse grupo a ser caracterizado com o formato arredondado (Lefèvre et al., 2011). Mais tarde outro representante esférico foi caracterizado, a cepa MWB-1 isolada na China (Lin et al., 2014). Ambas as células que apresentam o morfotipo arredondado também apresentam um tamanho grande (entre 3 e 4µm) e múltiplas cadeias de cristais anisotrópicos de magnetita (4 a 7) também dispostas na porção central da célula (Lefèvre et al., 2011; Lin et al., 2014).

Até recentemente, todas os representantes magnetotáticos pertencentes ao filo Nitrospirae haviam sido recuperados de locais com baixa salinidade (Spring et al., 1993; Flies et al., 2005; Lefevre et al., 2011; Lin et al., 2012a; Lin et al., 2012b). No início desse ano, Qian e colaboradores identificaram duas novas espécies de bactérias magnetotáticas pertencentes ao filo Nitrospirae em um ambiente marinho (Qian et al., 2019). Nomeadas como cepas BGC e WGC, esses organismos apresentam formato arredondado com tamanhos entre 3 e 5 µm e múltiplas cadeias de magnetossomos anisotrópicos aparentemente de magnetita distribuídos na periferia do citoplasma (Qian et al., 2019).

2. Justificativa

Após 40 anos da descoberta dos primeiros microrganismos magnetotáticos, muitas informações a respeito da estrutura celular, e do processo de formação e organização dos magnetossomos foram reveladas. Porém, muitas dessas informações são baseadas pela observação de um número limitado de representantes desse grupo que são filogeneticamente muito próximos e fisiologicamente semelhantes. Os avanços das técnicas independentes de cultivo foram cruciais para revelar um panorama mais abrangente da diversidade tanto filogenética e metabólica (através de técnicas moleculares) quanto ultraestrutural (através de técnicas de microscopia).

Trabalhos recentes baseados em análises moleculares de amostras ambientais revelaram a possível existência de microrganismos magnetotáticos pertencentes a classes e filos em que esses organismos nunca foram antes observados. Acreditamos que o avanço na observação e caracterização da morfologia e ultraestrutura desses novos microrganismos possibilite o descobrimento de novas estruturas e processos de organização celular inéditos em microrganismos magnetotáticos que possam auxiliar no entendimento do processo de biomineralização e compartimentalização em microrganismos de forma geral.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Classificar filogeneticamente e caracterizar de forma ultraestrutural e morfológica uma bactéria magnetotática encontrada no rio Ururaí em Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro através de técnicas independentes de cultivo.

3.2 Objetivos específicos

Observação da diversidade morfológica de organismos magnetotáticos encontrados em amostras coletadas no rio Ururaí.

Classificação filogenética e correlação entre dados filogenéticos e morfológicos relacionados ao grupo de bactérias magnetotáticas mais abundante em amostras coletadas no rio Ururaí.

Caracterização morfológica e ultraestrutural do grupo de bactérias magnetotáticas mais abundante em amostras coletadas no rio Ururaí e seus magnetossomos.

4. Metodologia

4.1 Coleta e concentração de bactérias magnetotáticas

As amostras ambientais foram coletadas rio Ururaí em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (21°45'30.5"S 41°28'38.4"O). Porções de sedimento e água do local foram coletadas em recipiente plástico em uma proporção de 2:1 (sedimento / água) e encaminhadas para o laboratório, onde foram armazenadas por um tempo aproximado de 3 meses em temperatura ambiente, sendo utilizados para diversos experimentos durante esse período. A concentração magnética foi realizada da mesma forma descrita em (Lins *et al.* 2003). De forma breve, o sedimento e a água de cada amostra foi misturado com o auxílio de uma espátula e, então, um ímã foi fixado com uma fita adesiva na parte lateral do recipiente a aproximadamente 1 cm acima da região correspondente à interface água/sedimento com a porção referente ao polo norte do ímã em contato com o frasco. Após 30-40 minutos o material localizado próximo ao ímã em cada recipiente contendo a amostra foi retirado com uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo de polipropileno de 50 ml. Nesse tubo, o processo de concentração magnética foi realizado mais uma vez, conforme descrito anteriormente e o material concentrado foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 ml. Caso necessário, esse material foi submetido a uma etapa de lavagem, realizada pela adição de água do local de coleta filtrada em filtro 0,22 µm após a repetição do processo de concentração magnética.

4.2 Amplificação do gene *rrs*

Para a realização das técnicas moleculares com o intuito de observar a diversidade filogenética, as amostras foram concentradas magneticamente, como descrito no tópico anterior e colocadas em 10 µl de tampão Tris-EDTA (TE) com pH 7,2 para serem armazenadas a -20°C até o momento do seu uso. As amostras foram descongeladas e submetidas à amplificação do gene que codifica a subunidade ribossomal 16S (*rrs*) pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). Cada reação foi preparada em tubos de polipropileno de 600 µl contendo: 1 µl de amostra, 20 pmol de cada um dos iniciadores, 25 µl da solução Green master mix (Promega) e 4 µl de água Milli-Q estéril. Após o preparo do mix, as condições programadas para a reação foram: 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30s,

50°C por 30s, e 72°C por 45s; e uma etapa final de inativação da enzima polimerase a 72°C por 10 min.

O resultado da reação foi atestado pela aplicação de 3 µl do produto da PCR em um gel contendo agarose a 1% e 3 µl de SYBR (Invitrogen) feito em 30 ml de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) pH 8,0. O gel contendo a amostra foi submetido a 80V por 30 min submerso em TAE. A visualização do produto da PCR no gel foi realizada com o auxílio de um trasluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia)

4.3 Clonagem, sequenciamento e análise filogenética

Após a confirmação da amplificação do gene *rrs*, os amplicons foram purificados com o kit Wizard PCR purification (Promega) e clonados na cepa competente DH5α da espécie *Escherichia coli* utilizando o kit pGem-T Easy vector (Promega) conforme as orientações dos fabricantes. Os clones obtidos foram sequenciados através do serviço de sequenciamento oferecido pela empresa Macrogen.

Sequências de genes *rrs* de outras bactérias foram adquiridas para serem utilizadas como referência a partir de buscas comparativas utilizando a ferramenta online BLAST-N (Altschul *et al.*, 1990). As sequências de referência e as sequências recuperadas após o sequenciamento foram alinhadas utilizando a ferramenta *ClustalW Multiple Alignment* do programa Bioedit (Hall, 1999). A análise filogenética foi representada por dendogramas desenvolvidos no programa MEGA 7.0 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando o método de máxima verossimilhança (Saitou e Nei, 1987) com o valor de *bootstrap* sendo calculado com base em 1000 réplicas.

4.4 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Utilizando as sequências recuperadas após o sequenciamento dos clones na etapa anterior, uma sonda específica baseada na sequência do gene *rrs* recuperada em maior número foi desenhada, nomeada NUR-1, e encaminhada para síntese e marcação com o fluoróforo Alexa 488 pela empresa Invitrogen (5´ -GGAAACTGCCAGCGATAAGCT- 3´). Para a realização da hibridização *in situ*, as bactérias magnetotáticas foram concentradas como descrito anteriormente, e fixadas em uma solução de etanol/PBS nas proporções 1:1. A reação de hibridização *in situ* foi executada conforme descrita por Pernthaler *et al.*(2001). Após a etapa

de lavagem, a lâmina contendo a amostra foi coberta com uma lamínula e observada em um microscópio AxioImager D2 (Zeiss – Alemanha), equipado com um sistema de fluorescência.

4.5 Microscopia ótica

Para a detecção e caracterização morfológica de microrganismos magnetotáticos, aproximadamente 10 µl da amostra ambiental magneticamente concentrada como descrito no tópico 5.1, foram adicionados em uma lamínula que foi posicionada sobre um anteparo de borracha localizado em cima de uma lâmina de vidro para microscopia. Essa montagem da amostra permitiu a observação dos microrganismos magnetotáticos em um microscópio óptico pela técnica de gota pendente (Wenter *et al.*, 2009). Para a visualização, foi utilizado os microscópios AxioImager D2 (Zeiss) e AxioPlan (Zeiss), ambos equipados com uma câmera AxioCam MRc (Zeiss). Para verificação do comportamento magnetotático, um ímã foi colocado ao lado da lâmina contendo a amostra, sendo esse invertido periodicamente.

4.6 Microscopia eletrônica de transmissão

A observação de bactérias magnetotáticas inteiras foi realizada a partir de uma alíquota de 10 µl da amostra concentrada magneticamente depositada em grades de cobre revestidas previamente com filme de Formvar e carbono. Após três minutos, foi retirado o excesso de amostra com um papel de filtro. As grades, foram observadas em um microscópio eletrônico de transmissão Morgagni (FEI) operado com voltagem de aceleração de 80 kV.

Amostras provenientes de coletas anteriores do mesmo local de estudo, foram previamente incluídas em resina PoliBed 812 (TedPella), cortadas em um ultramicrotomo (Leica) e contrastadas conforme descrito em Leão *et al.*, 2017. No presente trabalho imagens desses cortes foram adquiridos por uma câmera digital Megaview (Olympus) acoplada a um microscópio eletrônico de transmissão Morgagni (FEI) operando com voltagem de aceleração de 80kV.

4.7 Microscopia eletrônica no modo transmissão-varredura e microanálise

As amostras utilizadas para a realização dessas técnicas foram preparadas da mesma forma descrita para a observação de células inteiras na microscopia eletrônica de transmissão convencional. As grades contendo a amostra foram observadas em um microscópio eletrônico

de transmissão Titan (FEI) equipado com um detector de campo escuro anular, capaz de gerar imagens de contraste Z no modo transmissão-varredura, permitindo a observação dos magnetossomos mesmo no interior das células mais espessas. A microanálise dos magnetossomos foi realizada através da ferramenta *line-scan* (do inglês - escaneamento por linha) no mesmo microscópio, utilizando um sistema de quatro detector SDD capaz de realizar a análise de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS).

4.8 Medidas e análises estatísticas

As medidas de comprimento e largura dos magnetossomos e das células foram realizadas no programa iTEM (Olympus). Os valores de comprimento (C) e largura (L) dos cristais foram obtidos a partir das medidas de diâmetro máximo e diâmetro mínimo, respectivamente. O fator de forma foi definido como a razão entre a largura e o comprimento (L/C). Os gráficos e as análises estatísticas dos dados foram realizados no programa Prism 6.0 (GraphPad)

5. Resultados

5.1 Bactérias magnetotáticas presentes no rio Ururáí

Após realizar o procedimento de concentração magnética nas amostras coletadas no rio Ururáí, foi observada uma grande diversidade de bactérias magnetotáticas presente, com destaque especial para algumas células com formato arredondado e tamanho elevado e algumas outras células em formato de bastão de menor tamanho (Figura 3A). A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou que os microrganismos magnetotáticos de formato alongado apresentavam em sua grande maioria cristais anisotrópicos, porém pode ser notada uma grande diversidade na forma em que esses organismos organizam a suas cadeias de magnetossomos. Alguns indivíduos de menor tamanho apresentam uma única cadeia de magnetossomos anisotrópicos (Figura 3B-C), enquanto outros de tamanho médio apresentam duas cadeias curtas paralelas umas às outras (Figura 3D-E) e outras células de tamanho maior, apresentam múltiplas cadeias de cristais anisotrópicos distribuídas ao longo do eixo maior da célula bacteriana percorrendo todo o espaço citoplasmático (Figura 3F-G).

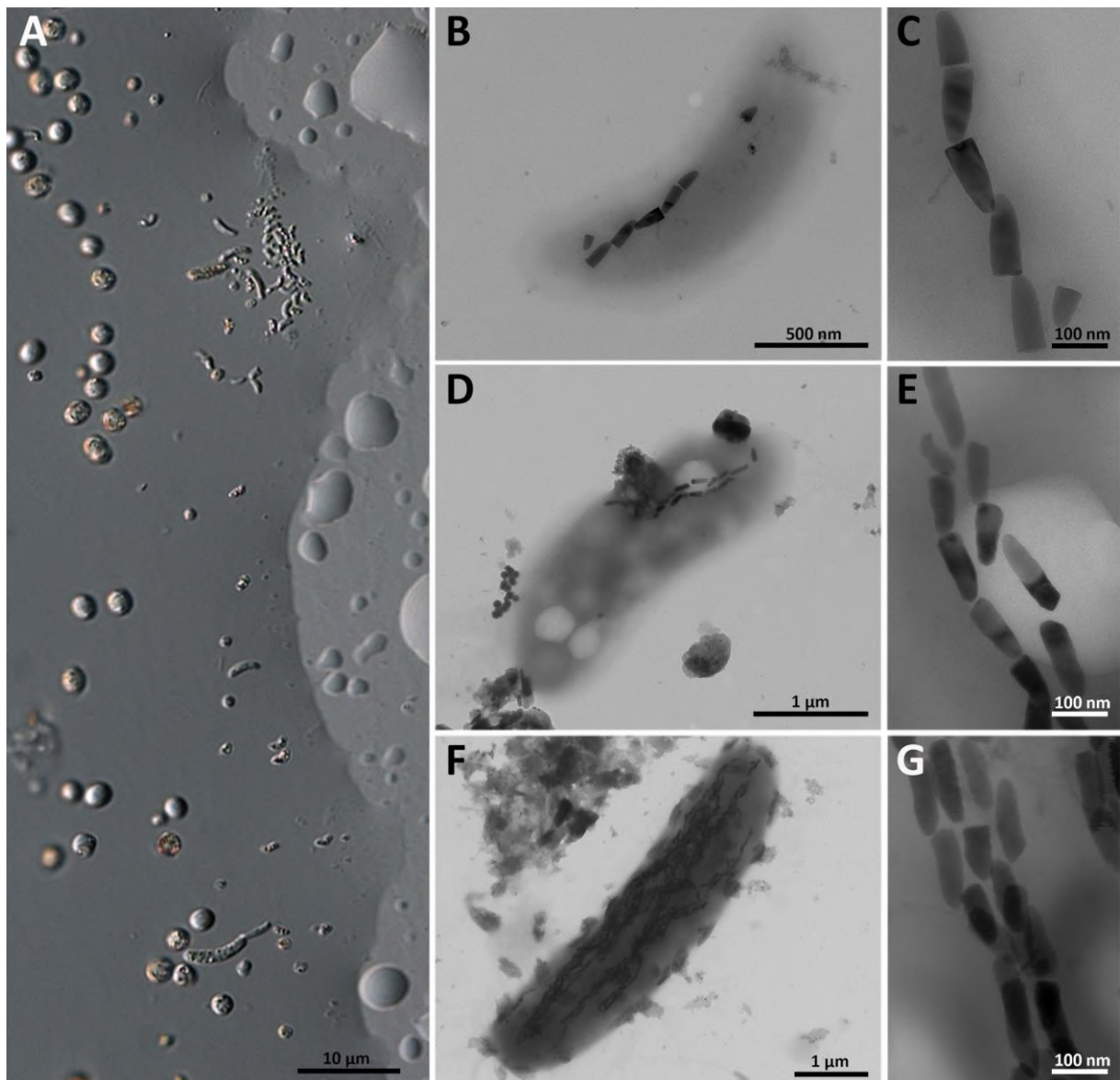


Figura 3. Diversidade morfológica de bactérias magnetotática em amostra do rio Ururui. A) Imagem utilizando DIC da diversidade morfológica encontrada em amostras coletadas no rio Ururui após concentração magnética. B) MET de bactérias magnetotática com formato alongado presente na amostra com magnetossomos anisotrópicos no seu interior (C). D) Bactéria magnetotática com formato de bastão apresentando duas cadeias de cristais anisotrópicos no seu interior (E). F) Bactéria magnetotática com morfologia alongada e grande tamanho, com múltiplas cadeias de magnetossomos anisotrópicos no seu interior (G).

Trinta dias após a coleta das amostras, foi realizada uma nova concentração magnética para a concentração de bactérias magnetotáticas. Nessa nova concentração pudemos observar que a concentração das células com formato arredondado havia aumentado, chegando a uma proporção de 40/1 em comparação com as células com formato de bastão (Figura 4A). Dentre as bactérias magnetotáticas com formato arredondado, um morfotipo chamava mais atenção na amostra. Células com um comprimento médio de $4,04 \mu\text{m}$ ($DP=0,47 \mu\text{m}$; $n=52$ células) e largura de $3,36 \mu\text{m}$ ($DP=0,38 \mu\text{m}$; $n=52$ células), apresentando diversas inclusões no seu interior que as deixavam com uma coloração dourada (Figura 4A). Análises iniciais por

microscopia eletrônica de transmissão mostraram a presença de múltiplas cadeias de magnetossomos anisotrópicos distribuídas pelo corpo celular bacteriano (Figura 4B-4C).

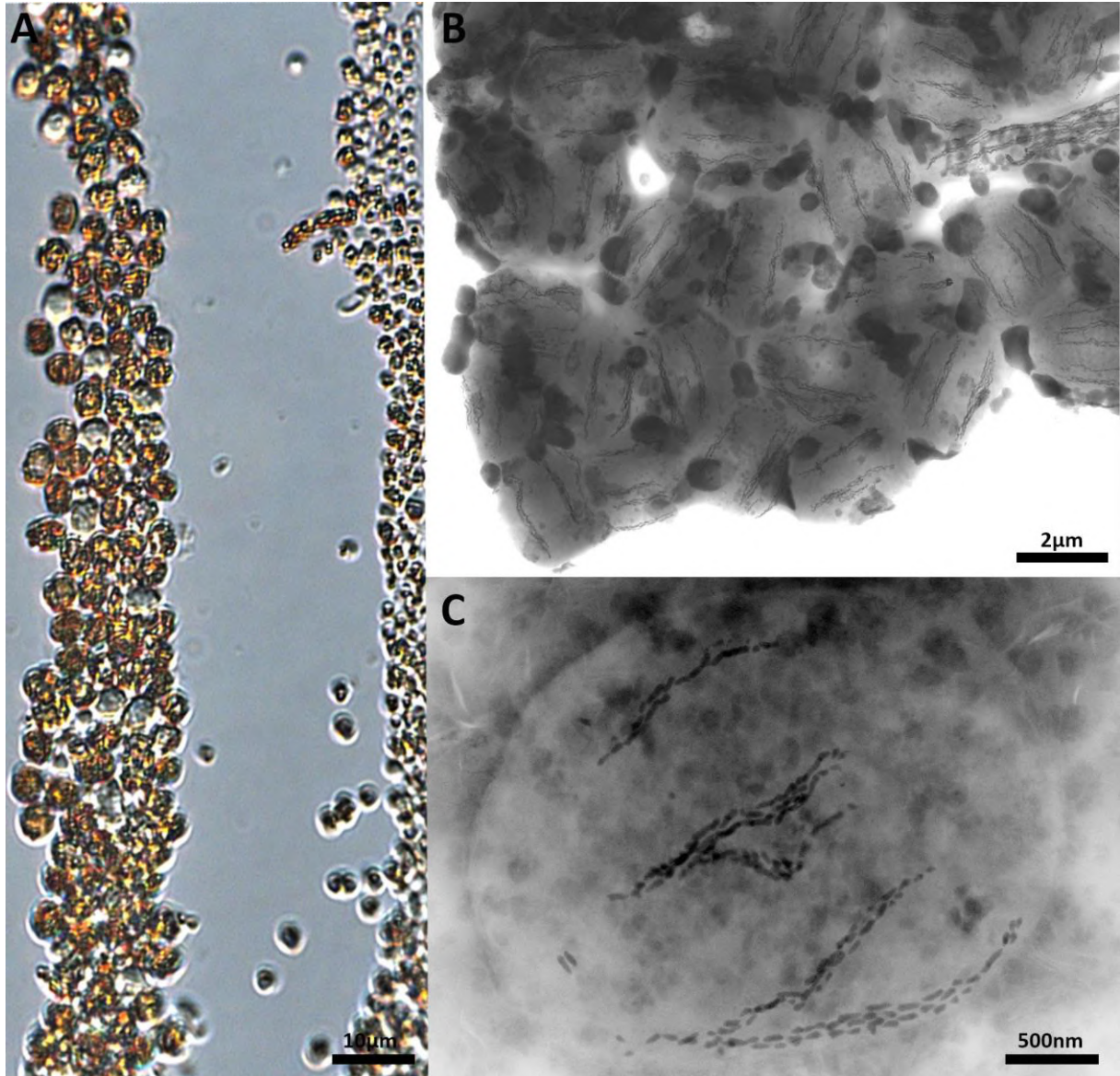


Figura 4. Grande concentração de bactérias com formato arredondado nas amostras coletadas no rio Ururaí. A) Imagem utilizando contraste de fase mostrando a grande abundância de bactérias magnetotáticas com formato arredondado, em especial células com o tamanho elevado e ricas em inclusões douradas. B) METV de células arredondadas provavelmente abundantes na mesma amostra. C) METV mostrando em maior detalhe uma das bactérias magnetotáticas presentes na imagem B, com detalhe maior as múltiplas cadeias de magnetossomos distribuídos pelo corpo celular bacteriano.

5.2 Classificação filogenética de bactéria magnetotática arredondada encontrada no rio Ururaí

Após a observação da dominância de células magnetotáticas com morfologia arredondada, tamanho elevado e com a presença de inclusões (Figura 4A). Foi realizada a amplificação do gene *rrs* com o intuito de classificarmos filogeneticamente este indivíduo. Foram sequenciados 16 clones contendo sequências do gene *rrs* recuperado de amostras concentradas magneticamente do rio Ururaí. Desses 16 clones, 11 apresentaram sequências idênticas (aproximadamente 68%), e essa sequência foi atribuída a um microrganismo chamado neste trabalho de cepa NUR-1 (Figura 5).

Baseado na sequência recuperada do organismo NUR-1, uma análise filogenética foi conduzida (Figura 5A). Analisando a topologia do dendograma apresentado, foi possível a identificação dos organismos filogeneticamente mais próximos a cepa NUR-1. A sequência mais próxima daquela pertencente a cepa NUR-1 pertence a cepa CS-04 (92,02% de identidade) que possivelmente foi recuperada de uma bactéria magnetotática, assim como a segunda sequência mais próxima, intitulada PI3A-10 (91,11% de identidade) isoladas de amostras coletadas em recifes de corais no sul do mar da China a partir de concentração magnética. A sequência mais próxima daquela recuperada da cepa NUR-1 que apresenta informação morfológica associada a ela é a sequência proveniente da bactéria magnetotática *Candidatus Magnetooovum mohavensis* (90,54% de identidade). Após essas análises podemos concluir que a cepa NUR-1 representa uma bactéria magnetotática pertencente ao filo Nitrospirae, e possivelmente a um novo gênero ainda não caracterizada da ordem Nitrospirales.

Para correlacionar um morfotipo celular presente na amostra magneticamente concentrada com a sequência do gene *rrs* recuperada da cepa NUR-1, foi utilizada a técnica de FISH com a sonda especificamente desenhada para o reconhecimento de bactérias pertencentes a cepa NUR-1. Conforme suspeitávamos, a cepa NUR-1 corresponde a bactéria magnetotática de forma arredonda e rica em grânulos (Figura 5B-E). Podemos observar na figura 5E que a sonda apresenta especificidade para a mesma célula observada em abundância na amostra utilizada para o sequenciamento (Figura 4A), não reconhecendo as células com morfologia arredonda sem os grânulos (Figura 5B), apesar destas terem sido coradas e reconhecidas

juntamente com as células da cepa NUR-1 pelo DAPI (Figura 5C) e pelo mix de sondas universais para bactérias, respectivamente (Figura 5D).

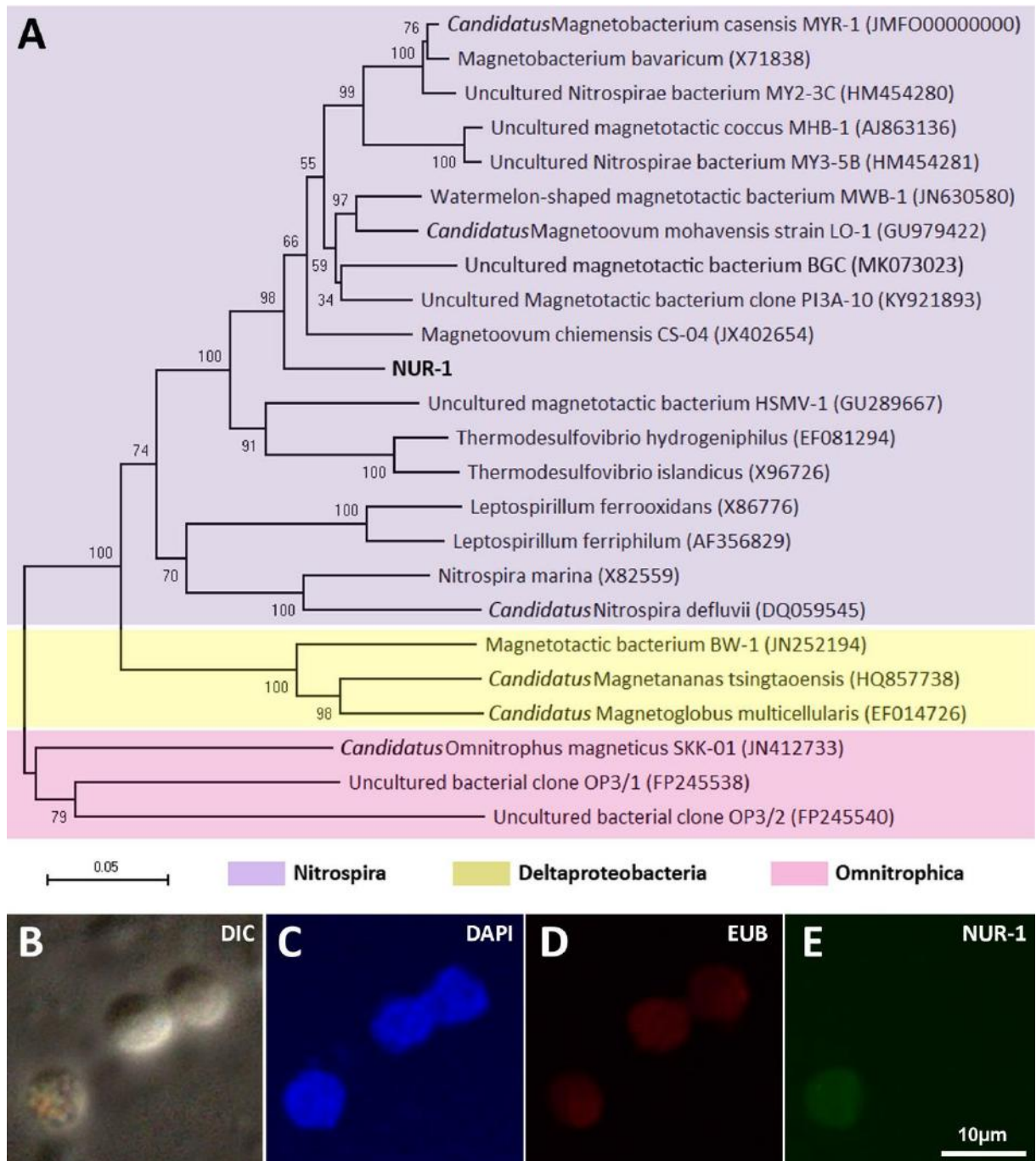


Figura 5. Posicionamento filogenético e correlação da filogenia com a morfologia celular da cepa NUR-1. A) Arvore filogenética mostrando a análise de Máxima verossimilhança baseada no *rrs* mostrando a posição da cepa NUR-1 em comparação com outras espécies de bacterianas. Em parênteses estão os números de acesso de cada sequência usada. B) Imagem em DIC de dois tipos celulares, um contendo múltiplas inclusões e outro sem nenhuma estrutura intracelular aparente. C) Microscopia de fluorescência (MF) da mesma região registrada em B após coloração com DAPI. D) MF da mesma região registrada em A após hibridização com a sondas EUB. E) Microscopia de fluorescência da mesma região registrada em A após hibridização com a sonda NUR-1.

5.3 Caracterização ultraestrutural de bactérias magnetotáticas da cepa NUR-1

Cortes ultrafinos de célula com morfologia coincidentes com aquela caracterizada como pertencente a indivíduos da cepa NUR-1 apresentaram múltiplas estruturas arredondadas ricas em material eletrólucido (de coloração clara na imagem) (Figura 6A), que são correspondentes com a distribuição dos grânulos com coloração dourada observados por microscopia ótica (Figura 4A). Os magnetossomos presentes nesta mesma secção da bactéria (Figura 6B) apresentam cristais com morfologia anisotrópica e uma membrana biológica circundando de forma individualizada cada um dos cristais (Figura 6B; setas). Imagens de bactérias da cepa NUR-1 inteiras obtidas no modo transmissão-varredura, permitiram a visualização da distribuição das cadeias de magnetossomos no citoplasma bacteriano (Figura 6C–D). Os cristais anisotrópicos ficam organizados em grupos de cadeias ao longo do eixo maior da célula (Figura 6C), e sempre próximos a membrana citoplasmática (Figura 6D).

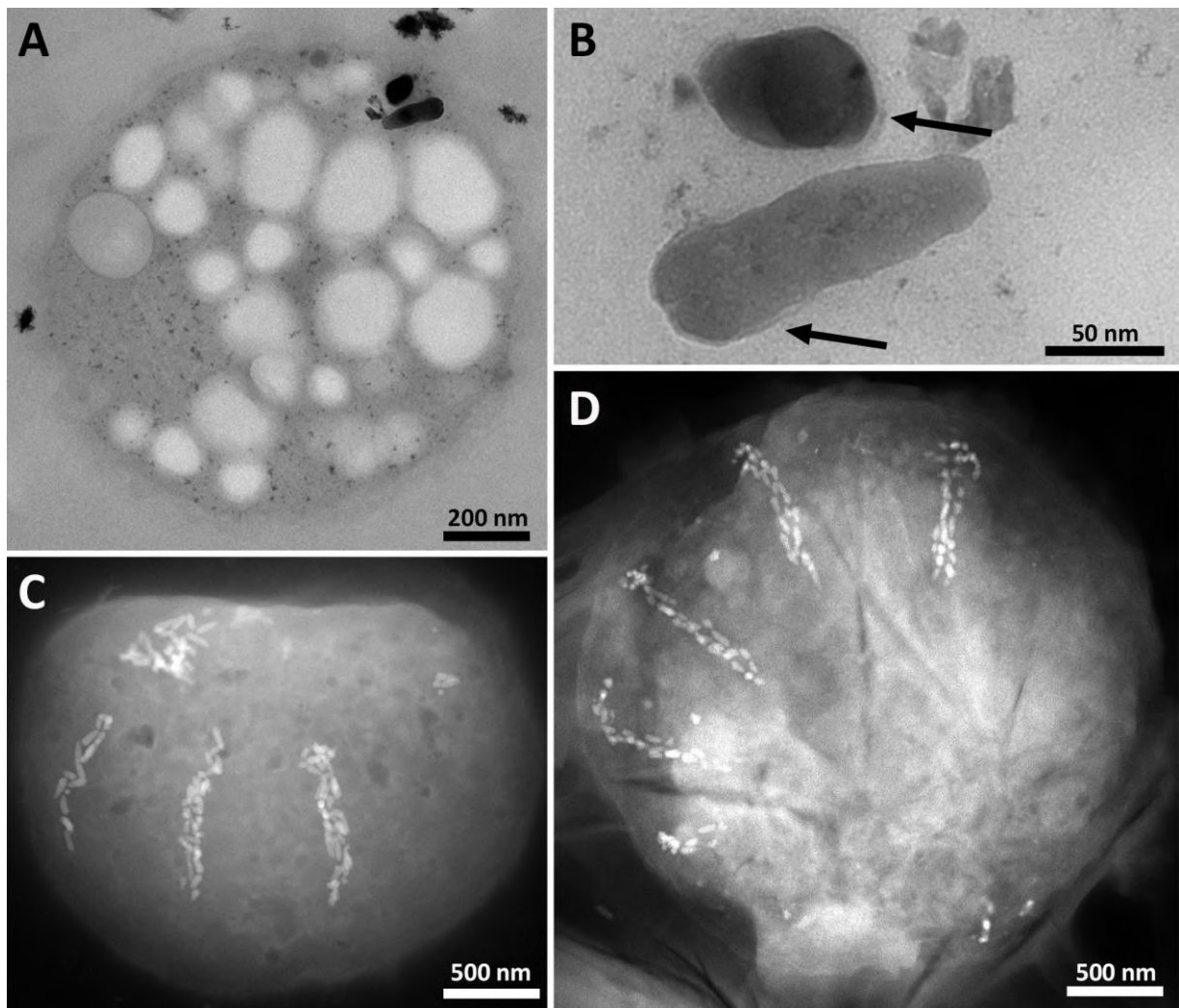


Figura 6. Análise ultraestrutural de bactérias da cepa NUR-1 por microscopia eletrônica. A) Corte ultrafino mostrando a grande quantidade de grânulos distribuídos no citoplasma celular e magnetossomos próximo a membrana plasmática. B) Magnetossomos no interior da célula mostrada na figura A, apresentando formato anisotrópico e uma fina membrana ao seu redor (setas). C) Cadeias de magnetossomos agrupadas ao longo da mesma direção no interior do corpo celular. D) Magnetossomos distribuídos na periferia do citoplasma de células da cepa NUR-1.

5.4 Caracterização dos magnetossomos presentes em células da cepa NUR-1

Após a constatação do formato anisotrópico dos magnetossomos, da sua organização em grupos de cadeias e distribuição ao longo da periferia de células da cepa NUR-1 (Figura 7), foi observado que esses cristais anisotrópicos apresentam comprimento médio de 120,6 nm (DP= 6,7 nm; n=208 cristais) (Figura 7A) e largura média de 41,7 nm (DP=2,7 nm; n=208) (Figura 7B). Como esperado para cristais anisotrópicos o valor médio do fator de forma foi de 0,35 (DP=0,08; n=208 cristais) (Figura 7C).

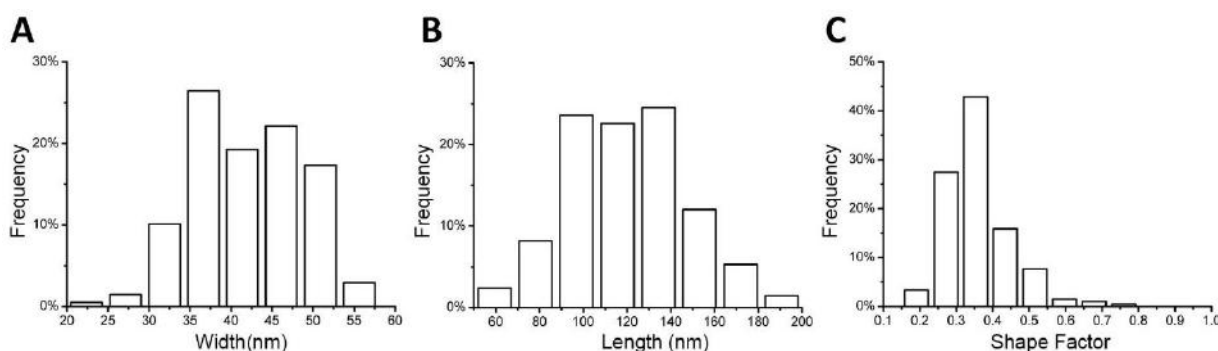


Figura 7. Análise do tamanho e do formato dos magnetossomos encontrados no interior de células da cepa NUR-1. Distribuição da frequência do comprimento (A), da largura (B) e do fator de forma (C) dos magnetossomos encontrados no citoplasma de células da cepa NUR-1.

A composição do cristal que compõe os magnetossomos produzidos por células da cepa NUR-1 foi inferida após a análise comparativa da presença dos elementos Fe, S, P e O ao longo de uma faixa que compreende regiões onde o cristal não é observado e regiões onde o cristal é observado (Figura 8). Inicialmente foi utilizado o modo transmissão-varredura para a melhor identificação da região contendo os magnetossomos no interior das células (Figura 8A-C). O cristal selecionado para a realização da análise está em destaque na Figura 8B (asterisco), e foi escolhido para ser utilizado por apresentar uma região adjacente sem a presença de outros magnetossomos. A área onde ocorrerá a varredura para a detecção dos elementos é demarcada pela caixa roxa, já a direção e o sentido nas quais ocorrerá a detecção é representada pela seta verde na mesma figura (Figura 8C). Na Figura 8D é possível ver a região em destaque na Figura 8C em maior aumento. Durante toda a varredura foi praticamente constante a concentração de S e de P, mostrando que não há aumento destes elementos na região onde o cristal está presente (aproximadamente entre 15nm e 55nm após o início da varredura). A concentração de Fe sofreu um grande aumento, saindo de próximo a 0 na porção da varredura referente a parte externa ao cristal, chegando até 80 na região mais central do magnetossomo, sendo consistente com o que era esperado. Já a concentração de O

sofreu um leve aumento na região da varredura onde o cristal está presente, saindo de um valor próximo a 80 na porção externa do magnetossomo, para valores próximos de 100 na região contendo o magnetossomo (Figura 8D). Os resultados desta microanálise mostram a presença de concentrações maiores de ferro e de oxigênio na região do magnetossomo, quando comparada com a região citoplasmática, e a constância na concentração de enxofre ao longo de toda a varredura. Baseado nestas informações foi inferido que o magnetossomo encontrado no interior das bactérias da cepa NUR-1 são de óxido de ferro, muito possivelmente de magnetita. (D) Análise por EDS sob os elementos Fe (ferro), S (enxofre), P (fósforo) e O (oxigênio)

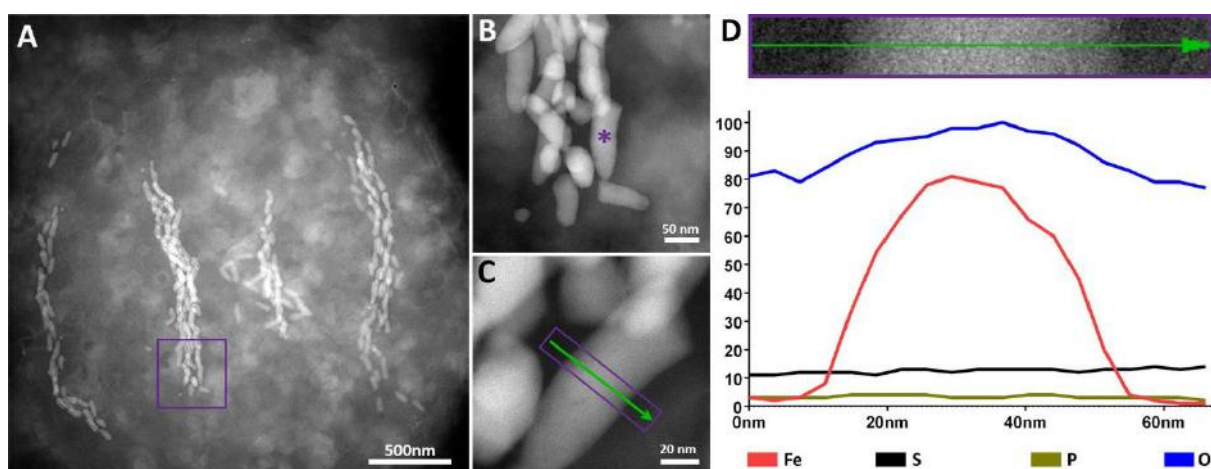


Figura 8. Análise do tamanho e do formato dos magnetossomos encontrados no interior de células da cepa NUR-1. Distribuição da frequência do comprimento (A), da largura (B) e do fator de forma (C) dos magnetossomos encontrados no citoplasma de células da cepa NUR-1. D) Área escaneada para análise de EDS, e gráfico misturando a quantidade relativa de Ferro (vermelho), Enxofre (preto), Fósforo (amarelo) e oxigênio (azul), ao longo da análise.

6. Discussão

Nos últimos tempos a quantidade de informação sobre microrganismos magnetotáticos vem aumentando. A capacidade de separar esse grupo de células dos outros indivíduos presentes em amostras ambientais e de concentrar magneticamente esses organismos possibilitou grandes avanços na aplicação de técnicas independentes de cultivo para a caracterização filogenética (Lin et al., 2018), estrutural (Leão et al., 2019) e genômica (Leão et al., 2017) de novos organismos magnetotáticos. Os estudos clássicos envolvendo a análise da diversidade de microrganismos magnetotáticos em amostras ambientais mostram que bactérias das ordens Magnetococcales e Rhodospirillales são as mais abundantes em ambientes de água doce (Lin et al., 2009; Lefèvre e Bazylinski, 2013). Esses estudos são chamados de clássicos por realizarem a concentração magnética seguida da caracterização molecular com o auxílio de marcadores filogenéticos, e a observação da presença dos

magnetossomos nas células da amostra através de microscopia eletrônica de transmissão. Mais recentemente, estudos fundamentados estritamente em técnicas moleculares permitiram a associação de genes de biomineralização com marcadores pertencentes a grupos filogenéticos onde bactérias magnetotáticas nunca antes haviam sido encontradas (Kolinko et al., 2012; Lin e Pan, 2015; Lin, Pan e Bazylinski, 2017; Lin et al., 2018). Nesse presente trabalho, as bactérias magnetotáticas observadas em maior abundância eram produtoras de magnetossomos com formato anisotrópico (Figura 3 e 4), o que indica que elas não são pertencentes a ordem Magnetococcales e nem a Rhodospirillales. Pelo formato dos cristais, podemos inferir que essas bactérias pertencem a grupos filogenéticos ancestrais de bactérias magnetotáticas, muito provavelmente a classe Deltaproteobacteria do filo Proteobacteria, ou ao filo Nitrospirae (Lin, Pan e Bazylinski, 2017). Outros estudos onde material genético foi retirado diretamente do sedimento, sem a etapa de concentração magnética, mostrou a dominância de bactérias magnetotáticas pertencentes ao filo Nitrospirae, assim como foi observado nesse trabalho (Xu et al., 2018), onde o organismo magnetotático mais abundante na amostra foi caracterizado com pertencente a uma nova cepa nomeada NUR-1, sendo essa cepa um novo representante da ordem Nitrospirales no filo Nitrospirae (Figura 5).

O formato das células pertencentes a cepa NUR-1 é peculiar, sendo arredondado e com tamanho elevado ($4,04\mu\text{m} \times 3,36\mu\text{m}$). Durante muito tempo, todas as células magnetotáticas caracterizadas no filo Nitrospirae apresentavam formato alongado, algumas com tamanho avantajado e uma grande quantidade de magnetossomos como a espécie *Ca. Magnetobacterium bavaricum* (Jogler et al., 2011), e a cepa MHB-1 (Flies et al., 2005), outras com tamanho mais modesto, e uma única cadeia de magnetossomos como a bactéria *Ca. Thermomagnetovibrio paiutensis* (Lefèvre et al., 2010). Em 2011, Lefèvre e colaboradores descreveram o primeiro representante magnetotático no filo Nitrospirae que apresenta formato arredondado, a célula *Ca. Magnetoovum mohavensis* cepa LO-1 (Lefèvre et al., 2011). Células pertencentes a essa cepa apresentam um grande tamanho ($3,5\mu\text{m} \times 2,7\mu\text{m}$) e a presença de inclusões que apresentaram características similares àquelas observadas na cepa NUR-1 quando observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. As inclusões observadas na cepa LO-1 foram identificadas sendo ricas em enxofre (Lefèvre et al., 2011), sendo a presença desses grânulos já observada em outras bactérias magnetotáticas do filo Nitrospirae (Spring et al., 1993; Jogler et al., 2010). Esses achados nos levam a acreditar que essa é a composição das inclusões também observadas na cepa caracterizada nesse trabalho (Figura 6A).

A organização dos magnetossomos ao longo do corpo celular de indivíduos magnetotáticos é um assunto de grande interesse, já que essa organização influencia de forma direta a resposta magnetotática desses indivíduos (Jogler et al., 2011; Abreu et al., 2013, Leão et al., 2017). Sobretudo em células contendo um número muito elevado de magnetossomos, com a *Ca. Magnetobacterium bavaricum* (Jogler et. 2011) e os representantes magnetotáticos multicelulares (Abreu et al., 2013, Leão et al., 2017) é de vital importância a correta localização e organização das cadeias contendo esses magnetossomos. A cepa NUR-1 aparenta ter uma organização bem controlada dos magnetossomos em cadeia ao longo do corpo celular (Figura 4C, Figura 6C e D). A disposição dos magnetossomos aparentemente na periferia da célula é similar àquela observada através de técnicas avançadas de microscopia na bactéria *Ca. Magnetobacterium bavaricum* (Jogler et. 2011).

A composição dos magnetossomos encontrados em organismos magnetotáticos até o momento, nos permite afirmar que somente magnetossomos de magnetita ou de greigita são produzidos por esses microrganismos (Bazylinski e Frankel 2004; Leão et al., 2019). A identificação de maiores concentrações de oxigênio e ferro na região citoplasmática contendo os magnetossomos, e a não alteração da concentração de enxofre em regiões citoplasmáticas contendo e não contendo os magnetossomos, nos permite afirmar que esses cristais são óxidos de ferro (Figura 8D), e conseqüentemente nos sugere fortemente que esses magnetossomos são compostos de magnetita. Outro fator que corrobora a classificação dos magnetossomos produzidos pela cepa NUR-1 como sendo de magnetita é o fato de todos os magnetossomos encontrados em outras bactérias do filo Nitrospirae até o momento serem de magnetita (Flies et al., 2005; Lefèvre et al., 2010; Jogler et. 2011; Lefèvre et al., 2011).

7. Conclusão

As amostras coletadas no rio Ururá apresentaram uma grande quantidade de bactérias magnetotáticas com diferentes morfotipos. Apesar dessa diversidade morfológica, grande parte das bactérias observadas produziam magnetossomos anisotrópicos, mas com diferentes tipos de organização dessas organelas no citoplasma bacteriano.

Apesar da diversidade morfológica apresentada na amostra, há a predominância de uma espécie caracterizada pela morfologia arredondada, comprimento médio de 4,04 μm e largura média de 3,36 μm e a presença de múltiplas inclusões citoplasmáticas. Essa cepa

bacteriana foi nomeada NUR-1 e caracterizada como pertencente ao filo Nitrospirae, e possivelmente pertencendo a uma nova família dentro da ordem Nitrospirales.

Células caracterizadas como pertencentes a cepa NUR-1 apresentam múltiplas inclusões em seu citoplasma que apresentam uma tonalidade dourada quando observadas na microscopia ótica, e se apresentam como estruturas eletrólucidas espalhadas por todo o citoplasma quando observadas em cortes ultrafinos desses indivíduos. Os magnetossomos produzidos por essas células foram identificados como contendo cristais de óxido de ferro com uma membrana biológica no seu entorno, e apresentam morfologia anisotrópica com comprimento médio de 120,6 nm, largura média de 41,7 nm e fator de forma média de 0,35. Esses magnetossomos no interior da célula se organizam em múltiplas cadeias alinhadas ao longo do corpo celular de forma espaçada e próximas a membrana citoplasmática.

8. Bibliografia

- Abreu, F., Silva, K.T., Martins, J.L. e Lins, U. (2006). Cell viability in magnetotactic multicellular prokaryotes. *Int Microbiol.* 9, 267-272.
- Abreu, F., Martins, J.L., Silveira, T.S., Keim, C.N., de Barros, H.G., Filho, F.J. e Lins, U. (2007). 'Candidatus Magnetoglobus multicellularis', a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 1318-1322
- Abreu, F., Cantao, M.E., Nicolás, M.F., Barcellos, F.G., Morillo, V., Almeida, L.G., Do Nascimento, F.F., Lefevre, C.T., Bazylinski, D.A., De Vasconcelos, A.T.R. and Lins, U. (2011) Common ancestry of iron oxide-and iron-sulfide-based biomineralization in magnetotactic bacteria. *The ISME journal*, 5(10), p.1634.
- Abreu, F., Silva, K.T., Leão, P., Guedes, I.A., Keim, C.N., Farina, M., e Lins, U. (2013). Cell adhesion, multicellular morphology, and magnetosome distribution in the multicellular magnetotactic prokaryote *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*. *Microscopy and Microanalysis*, 19(3), 535-543
- Abreu, F., Carolina, A., Araujo, V., Leão, P., Silva, K. T., Carvalho, F. M. D., Cunha, O. L., Almeida, L.G., Geurink, C., Farina, M., Rodelli, D., Jovane, L., Pellizari, V., Vasconcelos, A.T., Bazylinski, D. e Lins, U. (2016). Culture-independent characterization of novel psychrophilic magnetotactic cocci from Antarctic marine sediments. *Environmental microbiology*, 18(12), 4426-4441.
- Arakaki, A., Webb, J., e Matsunaga, T. (2003). A Novel Protein Tightly Bound to Bacterial Magnetic Particles in *Magnetospirillum magneticum* Strain AMB-1. *Journal of Biological Chemistry.* 278, 8745–8750.
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. e Jannasch, H.W. (1988). Anaerobic magnetite production by marine, magnetotactic bacterium. *Nature.* 334, 518-519.
- Bazylinski, D.A., Heywood, B.R., Mann, S. e Frankel, R. (1993). Fe₃O₄ and Fe₃SO₄ in a bacterium. *Nature.* 366, 218.
- Bazylinski, D.A. e Frankel R.B. (2004). Magnetosome Formation in Prokaryotes. *Nature Reviews Microbiology.* 2, 217-230.
- Bazylinski, D.A., Williams, T.J., Lefèvre, C.T., Berg, R.J., Zhang, C.L., Bowser, S.S., Dean, A.J. e Beveridge, T.J. (2013a). *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. *International Journal of Systematic and Environmental Microbiology.* 63, 801-808.
- Bazylinski, D.A., Williams, T.J., Lefèvre, C.T., Trubitsyn, D., Fang, J., Beveridge, T.J., Moskowitz, B.M., Ward, B., Schübbe, S., Dubbels, B.L. e Simpson, B. (2013b). *Magnetovibrioblastemorei* gen.nov., sp. nov., a

magnetotactic bacterium (Alphaproteobacteria: Rhodospirillaceae) isolated from salt marsh. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63, 1824-1833.

Bellini, S. (1963). Su di un particolare comportamento di batteri d'acqua dolce (On a unique behavior of freshwater bacteria). *Institute of Microbiology, University of Pavia, Italy*.

Blackburne R, Vadivelu VM, Yuan Z, Keller J. Kinetic characterisation of an enriched Nitrospirae culture with comparison to Nitrobacter. *Water research*. 2007 Jul 1;41(14):3033-42.

Blakemore, R. (1975). Magnetotactic bacteria. *Science*. 190, 337-379.]

Chen, Y.R., Zhang, R., Du, H.J., Pan, H.M., Zhang, W.Y., Zhou, K., et al. (2015) A novel species of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes from Lake Yuehu in China. *Environ Microbiol* 17: 637–647.

Chen, Y.R., Zhang, W.Y., Zhou, K., Pan, H.M., Du, H.J., Xu, C., Xu J.H., Pradel, N., Santini, C.L., Li, J.H., Huang, H., Pan, Y.X., Xiao, T. e Huang, H. (2016). Novel species and expanded distribution of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes. *Environmental Microbiology Reports*. 8, 218-226.

Descamps, E. C., Monteil, C. L., Menguy, N., Ginet, N., Pignol, D., Bazyliniski, D. A., e Lefèvre, C. T. (2017). *Desulfamplus magnetovallimortis* gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium from a brackish desert spring able to biomineralize greigite and magnetite, that represents a novel lineage in the Desulfobacteraceae. *Systematic and Applied Microbiology*. 40, 280-289.

Dziuba, M., Koziava, V., Grouzdev, D., Burganskaya, E., Baslerov, R., Kolganova, T., Chernyadyev, A., Osipov, G., Andrianova, 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66, 2069-2077.

Edwards TA, Calica NA, Huang DA, Manoharan N, Hou W, Huang L, Panosyan H, Dong H, Hedlund BP. Cultivation and characterization of thermophilic Nitrospirae species from geothermal springs in the US Great Basin, China, and Armenia. *FEMS microbiology ecology*. 2013 Aug 1;85(2):283-92.

Faivre, D., Fischer, A., Rubio, I.G., Mastrogiacomo, G. e Gehring, A.U. (2010). Development of Cellular Magnetic Dipoles in Magnetotactic Bacteria. *Biophysical Journal*. 99, 1268-1273.

Farina, M., Kachar, B., Lins, U., Broderick, R. e Lins De Barros, H. (1994). The observation of large magnetite (Fe₃O₄) crystals from magnetotactic bacteria by electron and atomic force microscopy. *Journal of Microscopy*. 173, 1-8.

Fassbinder JW, Stanjek H, Vali H. (1990) Occurrence of magnetic bacteria in soil. *Nature* 343, 161-163

Frankel, R.B.; Bazyliniski, D.A.; Johnson, M.S. e Taylor, B. (1997). Magneto- Aerotaxis in Marine Coccoid Bacteria. *Biophysical Journal*. 73, 994-1000.

Frankel, R.B. (2009). The discovery of magnetotactic/magneto-sensitive bacteria. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 27, 1-2.

Gorlenko, V. M., Dziuba, M. V., Maleeva, A. N., Panteleeva, A. N., Kolganova, T. V., e Kuznetsov, B. B. (2011). *Magnetospirillum aberrantis* sp. nov., a new freshwater bacterium with magnetic inclusions. *Microbiology*. 80, 692-702.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NY. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.

Hanzlik, M., Winklhofer, M. e Petersen, N. (2002). Pulsed-field-remnance measurements on individual magnetotactic bacteria. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 248, 258–267.

Ji, B., Zhang, S.D., Arnoux, P., Rouy, Z., Alberto, F., Philippe, N., Murat, D., Zhang, W.J., 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, 525-44.

Jogler, C. e Schüler, D. (2009). Genomics, Genetics, and Cell Biology of Magnetosome Formation. *Annual Review Microbiology*. 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. *Environmental Microbiology*. 12, 2466-2478
- Jogler C, Wanner G, Kolinko S, Niebler M, Amann R, Petersen N, Kube M, Reinhardt R, Schüler D. Conservation of proteobacterial magnetosome genes and structures in an uncultivated member of the deep-branching Nitrospirae phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 Jan 18;108(3):1134-9.
- Keim, C. N., Martins, J. L., Abreu, F., Rosado, A. S., de Barros, H. L., Borojevic, R., Lins, U. e Farina, M. (2004a). Multicellular life cycle of magnetotactic prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters*. 240, 203-208.
- Koch, H., Lückner, S., Albertsen, M., Kitzinger, K., Herbold, C., Spieck, E., ... & Daims, H. (2015). Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus Nitrospirae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11371-11376.
- Kolinko S, Jogler C, Katzmann E, Wanner G, Peplies J, Schüler D. Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3. *Environ Microbiol*. 2012;14:1709–21.
- Kolinko, S., Richter, M., Glöckner, F. O., Brachmann, A., e Schüler, D. (2016). Singlecell genomics of uncultivated deepbranching magnetotactic bacteria reveals a conserved set of magnetosome genes. *Environmental microbiology*, 18(1), 21-37.
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D. K., e Jensen, G. J. (2006). Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science*, 311(5758), 242-245.
- Komeili, A., Vali, H., Beveridge, T.J., e Newman, D.K. (2004). Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(11), 3839-3844.
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D. K., e Jensen, G. J. (2006). Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science*, 311(5758), 242-245.
- Komeili, A. (2007). Molecular mechanisms of magnetosome formation. *Annual Review of Biochemistry*. 76, 351-66.
- 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. and Abreu, F., 2019. Magnetosome magnetite biomineralization in a flagellated protist: evidence for an early evolutionary origin for magnetoreception in eukaryotes?. *Environmental microbiology*.
- Leão P, Chen YR, Abreu F, Wang M, Zhang WJ, Zhou K, Xiao T, Wu LF, Lins U. Ultrastructure of ellipsoidal magnetotactic multicellular prokaryotes depicts their complex assemblage and cellular polarity in the context of magnetotaxis. *Environmental microbiology*. 2017 Jun;19(6):2151-63.
- Lefèvre, C.T., Bernadac, A., YuZhang, K., Pradel, N., e Wu, L.F. (2009). Isolation and characterization of a magnetotactic bacterial culture from the Mediterranean Sea. *Environmental microbiology*, 11(7), 1646-1657.
- Lefevre, C.T., Abreu, F., Schmidt, M.L., Lins, U., Frankel, R.B., Hedlund, B.P., e Bazylnski, D.A. (2010a). Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada. *Applied and Environmental Microbiology*. 76, 3740-3743.
- Lefèvre, C. T., Frankel, R. B., Abreu, F., Lins, U., & Bazylnski, D. A. (2011a). Culture-independent characterization of a novel, uncultivated magnetotactic member of the Nitrospirae phylum. *Environmental microbiology*, 13(2), 538-549.
- Lefèvre, C.T., Frankel, R.B., Pósfai, M., Prozorov, T., e Bazylnski, D.A. (2011b). Isolation of obligately alkaliphilic magnetotactic bacteria from extremely alkaline environments. *Environmental Microbiology*. 13, 2342-2350.
- Lefèvre, C.T., Pósfai, M., Abreu, F., Lins, U., Frankel, R.B., e Bazylnski, D.A. (2011c). Morphological features of elongated-anisotropic magnetosome crystals in magnetotactic bacteria of the Nitrospirae phylum and the Deltaproteobacteria class. *Earth and Planetary Science Letters*. 312, 194-200.
- Lefèvre CT, Bazylnski DA. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*. 2013 Sep 1;77(3):497-526.
- Lefèvre, C.T., Trubitsyn, D., Abreu, F., Kolinko, S., Jogler, C., Almeida, L.G.P., de Vasconcelos, A.T., 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. *Environmental Microbiology*. 15, 2712-2735.

- Lefèvre, C.T. e Long Fei, W. (2013). Evolution of the bacterial organelle responsible for magnetotaxis. *Trends in Microbiology*. 21:534-43.
- Lins, U., Freitas, F., Keim C.N., Lins De Barros, H., Esquivel, D.M.S. e Farina, M. (2003). Simple homemade apparatus for harvesting uncultured magnetotactic microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34, 111-116.
- Lins, U., Keim, C. N., Evans, F. F., Farina, M. e Buseck, P. R. (2007). Magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) crystals in multicellular magnetotactic prokaryotes. *Geomicrobiology Journal*. 24: 43-50.
- Lin W, Li J, Schüler D, Jogler C, Pan Y. Diversity analysis of magnetotactic bacteria in Lake Miyun, northern China, by restriction fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology*. 2009 Aug 1;32(5):342-50.
- Lin, W., Deng, A., Wang, Z., Li, Y., Wen, T., Wu, L. F., Wu, M. e Pan, Y. (2014a). Genomic insights into the uncultured genus 'Candidatus Magnetobacterium' in the phylum Nitrospirae. *The ISME Journal*. 8, 2463-2477.
- Lin, W., Bazylinski, D.A., Xiao, T., Wu, L.F., e Pan, Y. (2014b). Life with compass: diversity and biogeography of magnetotactic bacteria. *Environmental Microbiology*. 16, 2646-2658.
- Lin, W., e Pan, Y. (2015). A putative greigitetype magnetosome gene cluster from the candidate phylum Latescibacteria. *Environmental Microbiology Reports*. 7, 237-242.
- Lin, W., Paterson, G.A., Zhu, Q., Wang, Y., Kopylova, E., Li, Y., Knight, R., Bazylinski, D.A., Zhu, R., Kirschvink, J.L. and Pan, Y., (2017). Origin of microbial biomineralization and magnetotaxis during the Archean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), pp.2171-2176.
- Lin W, Pan Y, Bazylinski DA. Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria. *Environ Microbiol Rep*. 2017;9:345–56.
- Lins, U., e Farina, M. (1999). Organization of cells in magnetotactic multicellular aggregates. *Microbiological Research*. 154, 9-13.
- Lohße, A., Ullrich, S., Katzmann, E., Borg, S., Wanner, G., Richter, M., Voigt, B., Schweder, T.e Schüler, D. (2011). Functional analysis of the magnetosome island in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: the mamAB operon is sufficient for magnetite biomineralization. *PLoS ONE* Vol. 6, e25561.
- Meldrum, F.C., Mann, S., Heywood, B.R., Frankel, R.B. e Bazylinski, R.B. (1993a). Electron microscopy study of magnetosomes in two cultured vibrioid magnetotactic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B*. 251, 237–242.
- Meldrum, F.C., Mann, S., Heywood, B.R., Frankel, R.B. e Bazylinski, D.A. (1993b). Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured Coccoid magnetotactic bacterium. *Proceedings of the Royal Society B*. 251, 231–236.
- Morillo, V., Abreu, F., Araujo, A. C., de Almeida, L. G., Enrich-Prast, A., Farina, M., de Vasconcelos, A.T.R. e 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. *Frontiers in microbiology*, 5.
- Murat, D., Quinlanc, A., Hojatollah, V. e Komeili, A. (2010). Comprehensive genetic dissection of themagnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. *PNAS*. 107, 5593–5598.
- Murat, D., Falahati, V., Bertinetti, L., Csencsits, R., Körnig,A., Downing, K., Faivre, D. e Komeili, A. (2012). The magnetosome membrane protein, MmsF, is a major regulator of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Molecular Microbiology*. 85, 684–699.
- Off, S., Alawi, M., & Spieck, E. (2010). Enrichment and physiological characterization of a novel Nitrospirae-like bacterium obtained from a marine sponge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(14), 4640-4646.
- Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lückner, S., ... & Loy, A. (2014). NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing N itrospira. *Environmental microbiology*, 16(10), 3055-3071.
- Pósfai, M., Kasama, T. e Dunin-Borkowski, R.E. (2007). Characterization of bacterial magnetic nanostructures using high-resolution transmission electron microscopy and off-axis electron holography. In: *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, 197-225. Editado por: Springer-Verlag D.Berlin Heidelberg, Berlin, SpringerVerlag.

- Prokscha, R.B., Schaffer, T.E., Moskowitz, B.M., Dahlberg, E.D., Bazylinski, D.A. e Frankel, R.B. (1995). Magnetic force microscopy of the 24submicron magnetic assembly in a magnetotactic bacterium. *Applied Physics Letters*. 66, 2582-2584.
- Qian, X. X., Liu, J., Menguy, N., Li, J., Alberto, F., Teng, Z., ... & Wu, L. F. (2019). Identification of novel species of marine magnetotactic bacteria affiliated with Nitrospirae phylum. *Environmental microbiology reports*, 11(3), 330-337.
- Richter, M., Kube, M., Bazylinski, 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. *Journal of Bacteriology*. 189: 4899.
- Sakaguchi, T., Arakaki, A. e Matsunaga, T. (2002). *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 215-221.
- Scheffel, A., Gruska, M., Faivre, D., Linaroudis, A., Pitzko, M. e Schüler, D. (2006). An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature*. 440, 110-114.
- Scheffel, A., Gardes, A., Grünberg, K., Wanner, G. e Schüler, D. (2008). The major magnetosome proteins MamGFDC are not essential for magnetite biomineralization but regulate the size of Magnetosome Crystals. *Journal of Bacteriology*. 190, 377-386.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., e Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Tanaka, M., Mazuyama, E., Arakaki, A. e Matsunaga, T. (2011). MMS6 Protein Regulates Crystal Morphology during Nano-sized Magnetite Biomineralization in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 286, 6386-6392.
- Uebe, R., e Schüler, D. (2016). Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 14, 621-637.
- Ulrich, S., Kube, M., Schubbe, S., Reinhardt, R. e Schüler, D.A.(2005). Hypervariable 130-Kilobase Genomic Region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* Comprises a Magnetosome Island Which Undergoes Frequent Rearrangements during Stationary Growth. *Journal of Bacteriology*. 187, 7176-84.
- Van Kessel, M. A., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., den Camp, H. J. O., Kartal, B., ... & Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555.
- Wang, Y., Lin, W., Li, J., e Pan, Y. (2013). High diversity of magnetotactic Deltaproteobacteria in a freshwater niche. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, 2813-2817.
- 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. *Environmental Microbiology*. 11, 1493-1505.
- 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). *International Journal of Systematic and Environmental Microbiology*. 62, 2443-2450.
- Xu C, Zhang W, Pan H, Du H, Xiao T. Distribution and diversity of magnetotactic bacteria in sediments of the Yellow Sea continental shelf. *Journal of soils and sediments*. 2018 Jul 1;18(7):2634-46.
- Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, Daims H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002 Dec 1;81(1-4):665-80.
- Zhang, W.Y., Zhou, K., Pan, H.M., Yue, H.D., Jiang, M., Xiao, T. e Wu, L.F. (2012). Two genera of magnetococci with Bean-like Morphology from intertidal sediments of the Yellow Sea, China. *Applied Environmental Microbiology*. 78, 5606-5611.
- Zhou, K., Zhang, W., Zhang, K.Y., Pan, H., Zhang, S., Zhang, W., Yue, H., Li, Y., Xiao, T. e Wu, L.F. (2012). A novel genus of multicellular magnetotactic prokaryotes from the Yellow Sea. *Environmental Microbiology*. 14, 405-413.