

EDUARDO MONTEIRO DE RESENDE

MOTILIDADE E ULTRAESTRUTURA DA BACTÉRIA
Magnetofaba australis CEPA IT-1



Monografia a ser 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
DEZEMBRO / 2017**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação dos Professores Ulysses Lins e Fernanda Abreu.

FICHA CATALOGRÁFICA

M429m Monteiro de Resende, Eduardo

Motilidade e Ultraestrutura da bactéria *Magnetofaba australis* cepa IT-1 / Eduardo Monteiro de Resende. -- Rio de Janeiro, 2017. 39 f.

Orientador: Fernanda de Avila Abreu .

Trabalho de conclusão de curso (graduação) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. Bactérias magnetotáticas. 2. Magnetotaxia. 3. Microscopia eletrônica de transmissão. 4. Reconstrução tridimensional. I. de Avila Abreu , Fernanda, orient.
II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo Monteiro de Resende

Motilidade e Ultraestrutura da bactéria magnetotática *Magnetofaba australis* cepa IT-1

Rio de Janeiro, 05 de dezembro de 2017

(Leonardo Nimrichter, Doutor em Ciências - Microbiologia, UFRJ)

(Gabriele Vargas Cesar, Doutora em Ciências - Microbiologia, UFRJ)

(Fernando Pereira Almeida, Doutor em Ciências – Microbiologia, CENABIO-UFRJ)

(Diogo de Azevedo Jurelevicius, Doutor em Ciências – Microbiologia, UFRJ)

Dedico este trabalho aos meus avós, Luiz e Marlene.

Obrigado por estarem sempre presentes!

Agradecimentos

Ao professor Ulysses que me aceitou no LabMax, me orientou e me apresentou ao fantástico mundo de bactérias magnetotáticas, ensinando tudo o que sei sobre Microscopia Eletrônica despertando meu interesse por essas áreas, além de sempre ter me estimulado a buscar a excelência em tudo que faço.

À minha orientadora Fernanda, que esteve sempre disposta a me ajudar com meus problemas e sempre me deu forças e me estimulou a ter foco no que faço.

Ao meu coorientador Pedro Leão, que sempre me ajudou com minhas dúvidas e com meu projeto.

Aos meus avós, Luiz e Marlene, que estiveram sempre presentes e me ajudaram a superar todos os problemas e nunca deixaram de me incentivar a buscar meus sonhos. Obrigado por serem sempre meu porto seguro.

A meus pais, Luis e Monica, que nunca deixaram de me ajudar e sempre fizeram de tudo para que eu seguisse meus sonhos.

A meus irmãos André e Beatriz, que estiveram sempre ao meu lado me dando forças nos momentos bons e ruins.

À minha namorada, Mariana, que sempre consegue me alegrar e esteve do meu lado me dando força até nos momentos mais desgastantes que passei.

Ao Jefferson Cyprinano, do LabMax, que me ajudou com meus cortes seriados e me deu dicas preciosas para obtenção das imagens em série.

A todos do LabMax que convivo e convivi, que estiveram sempre presentes nos momentos bons e ruins.

À UniMicro e ao CENABIO e todos seus funcionários pelo suporte necessário para conclusão do meu projeto.

Ao CNPq, FAPERJ e ao CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo

EDUARDO MONTEIRO DE RESENDE

MOTILIDADE E ULTRAESTRUTURA DA BACTÉRIA MAGNETOTÁTICA

Magnetofaba australis cepa IT-1

Orientadores: Ulysses Lins e Fernanda Abreu

Bactérias magnetotáticas possuem a capacidade de produzir uma organela que é composta por um nanocristal magnetotático envolto por uma bicamada lipídica denominada magnetossomo. Magnetossomos, quando alinhados em cadeia(s) dentro da célula, permitem uma orientação passiva da célula em relação ao campo geomagnético. Essa orientação passiva associada à natação ativa gerada pelo movimento flagelar, dá origem ao comportamento denominado magnetotaxia. A magnetotaxia é um mecanismo que otimiza o deslocamento das bactérias magnetotáticas ao longo de gradientes em ambientes quimicamente estratificados, permitindo que elas achem as condições ideais para sobrevivência e crescimento. Uma vez que as bactérias magnetotáticas são sensíveis a concentrações atmosféricas de O₂, sendo microaerófilas ou anaeróbicas, a magnetotaxia facilita o posicionamento dessas bactérias na região de interface óxica-anóxica em ambientes aquáticos. O modelo clássico de magnetotaxia é explicado com base em células alongadas, como espirilos, vibriões e bacilos, que possuem a cadeia de magnetossomos alinhadas ao longo do maior eixo da célula, sendo também esse eixo coincidente ao posicionamento dos flagelos e eixo natatório da bactéria. Este trabalho visa estudar a relação entre a ultraestrutura da bactéria cocóide *Magnetofaba australis* cepa IT-1, especificamente da cadeia de magnetossomos e flagelos e a influência dessa relação com as características de motilidade dessa célula utilizando técnicas de congelamento em alta pressão, substituição a frio e microscopia eletrônica de transmissão. A ultraestrutura de *Mf. australis* cepa IT-1 foi observada a partir de cortes seriados usando microscopia eletrônica de transmissão e a partir desses cortes seriados, foi possível gerar um modelo tridimensional da célula, no qual é possível observar a relação entre a cadeia de magnetossomos e os flagelos da célula. Por microscopia eletrônica de transmissão foi possível

notar a presença de uma estrutura semelhante a capa, porém menos extensa e de estruturas filamentosas semelhantes à arranjos de quimiorreceptores em regiões opostas da célula. A reconstrução tridimensional de *Mf. australis* cepa IT-1 mostrou que as estruturas filamentosas se estendem por uma região da célula próxima aos flagelos formando um disco. O modelo confirmou a suspeita que se tinha em relação a disposição espacial da cadeia de magnetossomos em relação aos flagelos, mostrando que ela está aproximadamente perpendicular e conseqüentemente desalinhada em relação as linhas de campo magnético e eixo natatório. Assim, provavelmente os mecanismos de funcionamento da magnetotaxia nessa célula cocoide diferem do modelo geral descrito na literatura.

Palavras chave: bactérias magnetotáticas, magnetossomos, magnetotaxia, microscopia eletrônica, reconstrução tridimensional.

ABSTRACT

EDUARDO MONTEIRO DE RESENDE

ULTRASTRUCTURE AND MOTILITY IN THE MAGNETOTACTIC BACTERIUM *Mf. australis* strain IT-1

Magnetotactic bacteria have the ability to produce an organelle that is composed of a magnetotactic nanocrystal surrounded by a lipid bilayer called magnetosome. Magnetosomes, when aligned in chain(s) within the cell, allows a passive orientation of the cell with geomagnetic field. This passive orientation associated with active swimming generated by the flagellar movement originates the behavior called magnetotaxis. Magnetotaxis is a mechanism that optimizes the movement of magnetotactic bacteria along gradients in chemically stratified environments, allowing them to find the ideal conditions for survival and growth. The classic model of magnetotaxis is explained based on elongated cells, such as spirilla, vibrios and rods, which have the chain of magnetosomes aligned along the largest axis of the cell, and this axis coincides with the position of the flagella and the swimming axis of the bacterium. The objective of this work is to study the relationship between the ultrastructure of coccoid bacterium *Mf. australis* strain IT-1, specifically the chain of magnetosomes and flagella and the influence of this relationship with the motility characteristics of that cell using high pressure freezing, cold replacement and transmission electron microscopy. The ultrastructure of *Mf. australis* strain IT-1 was observed from serial sections using transmission electron microscopy and from these sections, it was possible to generate a three-dimensional model of the cell, in which it is possible to observe the relationship between the magnetosome chain and the cell flagella. By transmission electron microscopy it was possible to note the presence of a structure similar to a sheath but less extensive, and a structure and filamentous structures similar to the chemoreceptor arrays in opposite regions of the cell. The three-dimensional reconstruction of *Mf. australis* strain IT-1 showed that the filamentous structures extend through a region of the cell near the flagella forming a disk. The model confirmed the spatial arrangement of the magnetosome chain in relation to the flagella, showing that it is approximately perpendicular and consequently misaligned with the magnetic field lines and swimming axis. Thus, probably the mechanisms of magnetotaxis functioning in this coccoid cell differ from the general model described in the literature.

Key words: Magnetotactic bacterium, magnetosomes, magnetotaxis, transmission electron microscopy, three-dimensional reconstruction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Histórico.....	11
1.2. Bactérias Magnetotáticas	11
1.2.1. Magnetossomos e Biomineralização	13
1.2.2. Magnetotaxia	16
1.3.1. <i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1	19
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Cultivo da bactéria magnetotática <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.....	24
4.2. Manutenção e observação das culturas de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1	26
4.3. Congelamento por alta pressão (High Pressure Freezing).....	26
4.4. Substituição a frio	26
4.5. Ultramicrotomia e obtenção de cortes seriados	26
4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	27
4.7. Reconstrução com modelo 3D	27
5. RESULTADOS	27
5.1. Características das culturas <i>Mf. australis</i> cepa IT-1	27
5.2. Ultraestrutura de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.....	28
5.3. Reconstrução tridimensional de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1	30
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÕES	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

As bactérias magnetotáticas (BMs) foram observadas primeiramente por Salvatore Bellini, um pesquisador italiano em 1958 (Bellini, 1963a). Utilizando técnicas de microscopia óptica, ele observou que essas BMs tinham característica incomum de se deslocarem ao longo das linhas de campo magnético e chegou a conclusão inicial de que elas possuíam uma espécie de bússola interna que as permitia se deslocarem alinhadas a esse campo (Bellini, 1963a; Bellini, 1963b). Bellini começou a estudar essas bactérias e em 1963 publicou um estudo onde ele as descrevia e sugeria que essa atração ao campo geomagnético (CGM) que ele observou seria uma “magneto-sensitividade” presente nessas bactérias (Bellini, 1963a; Bellini, 1963b; Bellini, 2009).

Em 1975, Richard Blakemore acidentalmente redescobriu essas bactérias e passou a estudá-las com o uso de microscopia eletrônica, conseguindo observar e detalhar a presença de cadeias de nanocristais ricos em ferro que, segundo Blakemore, possivelmente seriam de magnetita (Fe_3O_4) (Blakemore, 1975). Nesse mesmo estudo, foi descrito que células mortas dessas bactérias não se deslocavam em direção ao campo magnético, não sendo, portanto, simplesmente atraídas por magnetismo como Bellini sugeriu, mas tinham capacidade de se orientar passivamente ao campo (Blakemore, 1975). A orientação passiva associada à natação ativa por flagelos permite a movimentação das BMs ao campo, em um fenômeno chamado de magnetotaxia (Blakemore, 1975). Ainda nesse mesmo trabalho, ele observou que todas as bactérias magnetotáticas possuíam cadeias de nano cristais, que posteriormente seriam denominados magnetossomos, o fato de serem vistos em todas as BMs que ele encontrou levou a suspeita de uma relação entre as cadeias de magnetossomos e a magnetotaxia observada nessas bactérias (Blakemore, 1975).

1.2. Bactérias Magnetotáticas

O termo “bactéria magnetotática” não possui significado taxonômico. As BMs possuem grandes diferenças morfológicas, fisiológicas e filogenéticas entre si (Bazylinski & Frankel, 2004). As BMs são procariotos aquáticos encontrados em diversas regiões diferentes no mundo, com diversas morfologias celulares (Figura 1), tendo sido descritos cocos, vibriões, bacilos, espirilos e até formas multicelulares (Faivre & Schuler, 2008). As BMs pertencem a

diversos grupos filogenéticos como Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria do filo Proteobacteria, filo Nitrospirae e no superfilo PVC (Figura 2) (Lefèvre *et al.*,2013). A maior parte das BMs cultivadas atualmente pertence à classe *Alphaproteobacteria* e produzem nano cristais de óxido de ferro (Faivre & Schuler, 2008).

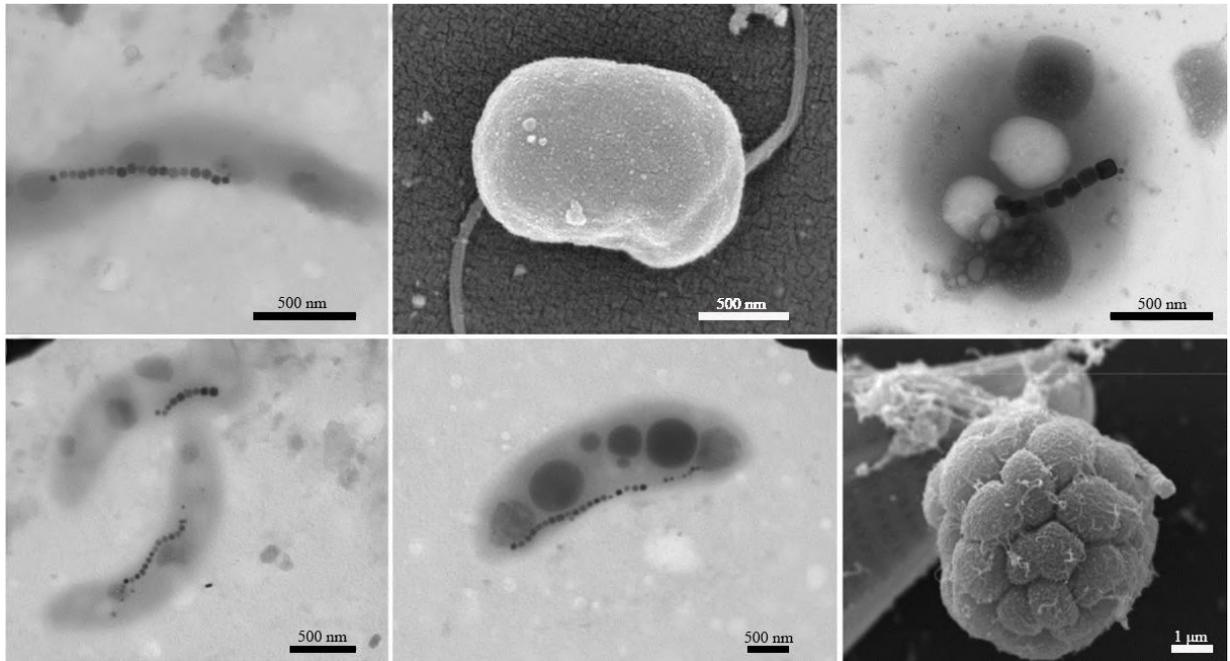


Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão (A, C, D, E) e microscopia eletrônica de varredura (B, F) destacando a diversidade morfológica entre bactérias magnetotáticas. As morfologias destacadas são espirilo (A), cocos (B e C), vibrião (D), bastonetes (E) e forma multicelular (F). Fonte: Acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia.

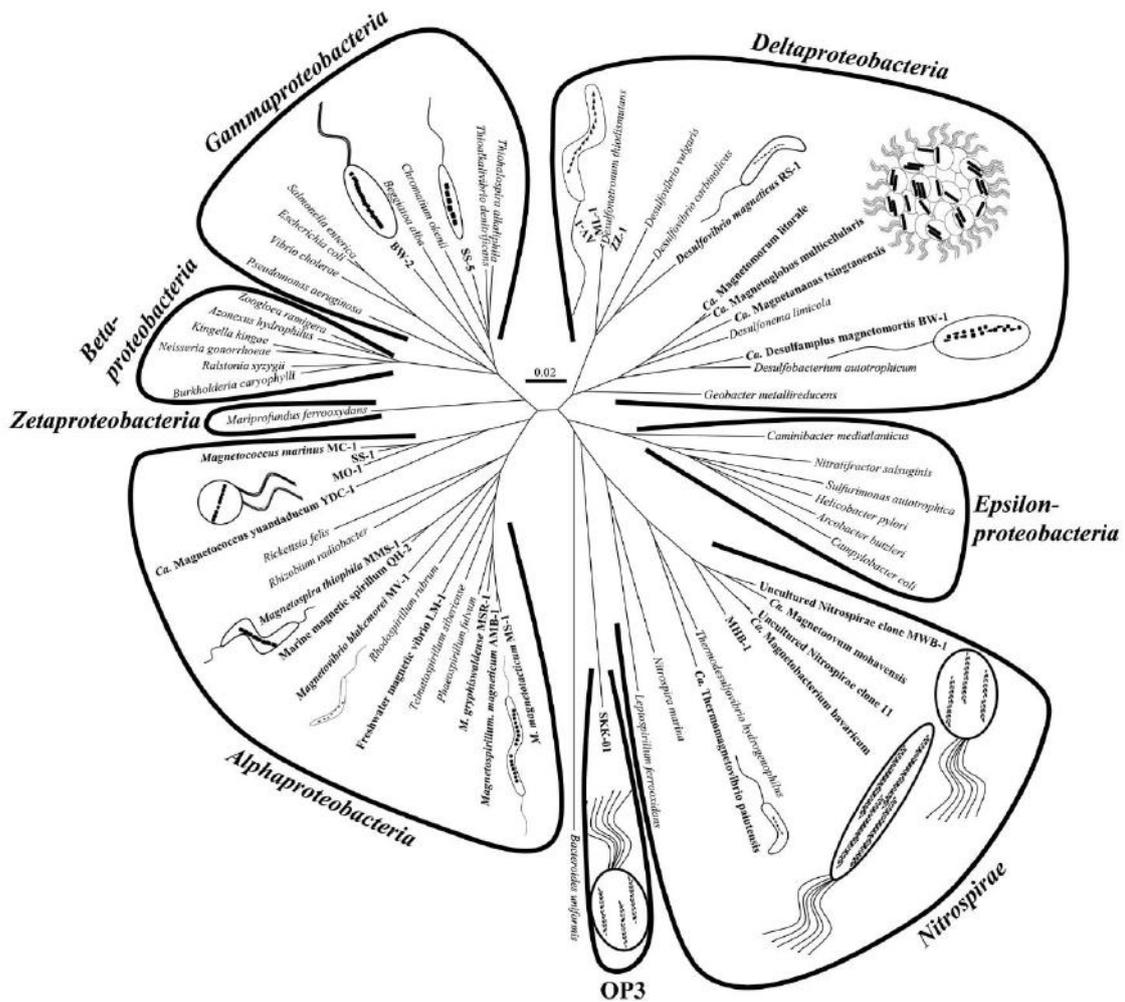


Figura 2: Distribuição filogenética das bactérias magnetotáticas (cultivadas e não cultivadas) no domínio Bacteria (retirado de Lefèvre *et al.*, 2013).

1.2.1. Magnetossomos e Biomineralização

Apesar da diversidade e diferenças entre as BMs, todas são bactérias Gram-negativas de ambiente aquáticos que possuem organelas intracelulares denominadas magnetossomos (Faivre & Schuler, 2008). Magnetossomos são organelas intracelulares formadas por uma parte inorgânica que é constituída por um nanocristal magnético de magnetita (Fe_3O_4) ou um de greigita (Fe_3S_4) e uma parte orgânica denominada membrana do magnetossomo (MM) (Gorby, Y. A., Beveridge, T. J., & Blakemore, R.P., 1988; Mann *et al.*, 1990; Frankel *et al.*, 1997). A parte orgânica é formada por uma bicamada lipídica (similar a membrana citoplasmática) contendo proteínas e polissacarídeos (Bazylinski & Frankel, 2004; Faivre & Schuler, 2008). Os magnetossomos se alinham em cadeias ao logo da célula e possuem características como alta pureza química (Bazylinski *et al.*, 1995), tamanho estreito de cada

nanocristal variando de 30 a 120 nm e poucos defeitos cristalográficos observados (Bazylnski & Frankel, 2004). Os magnetossomos possuem ser caracterizados morfologicamente (Figura 3) como cuboetaédricos, prismáticos ou ponta de lança. Essas morfologias costumam ser espécie específica, isto é, cada espécie produz um único tipo morfológico de magnetossomo (Faivre & Schuler, 2008).

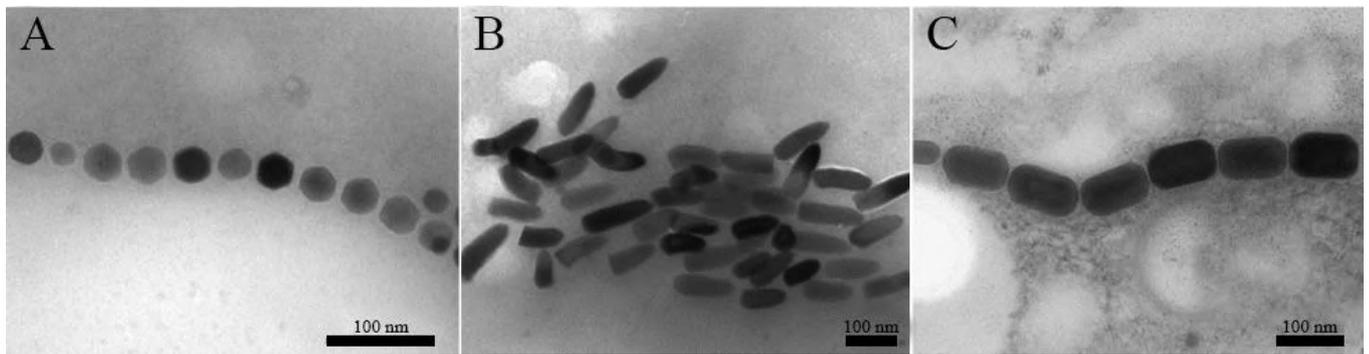


Figura 3: Diversidade morfológica dos magnetossomos vista em Microscopia eletrônica de transmissão. Formas dos magnetossomos de magnetita cuboetaédrico (A), ponta de lanças (B) e prismáticos (C). Fonte: acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia.

Associado a MM, há diversas proteínas que são classificadas como: Mam (são proteínas do magnetossomo, do inglês *Magnetosome membrane*), Mms (são proteínas específicas da membrana do magnetossomo, do inglês *Magnetosome membrane specific*) e Mtx (proteínas de magnetotaxia, do inglês *Magnetotaxis*) (Faivre & Schuler, 2008). Algumas dessas proteínas relacionadas ao magnetossomos são divididas em famílias de acordo com suas características (Faivre & Schuler, 2008), como, por exemplo:

- TPR (repetições de tetratricopeptídeos, do inglês *Tetratricopeptide repeat*). Ex.: MamA
- Transportadores CDF (do inglês *Cation Diffusion Facilitator*). Ex.: MamB e MamM;
- Serinas proteases HtrA-like. Ex: MamE, MamP, MamO;
- Proteínas homólogas a actina (do inglês *Actin-like proteins*). Ex.: MamK;
- Transportadores genéricos. Ex.: MamH e MamB.

Há também um grupo de proteínas sem homologia com nenhuma outra proteína em organismos não magnetotáticos. Ex.: MamG, MamF, MamD, MamC, MamJ, MamW, MamX, MamY, Mms6, MmeA e MtxA (Faivre & Schuler, 2008).

As proteínas da MM possuem composição bastante distinta das proteínas encontradas em outros compartimentos subcelulares da mesma bactéria (Grünberg *et al.*, 2004). A função de muitas dessas proteínas de MM ainda não foi totalmente elucidada, mas já é conhecido a importância de várias delas no processo de biomineralização dos magnetossomos e formação de cadeia de magnetossomos dentro da célula (Faivre & Schuler, 2008; Morilo *et al.*, 2004). Todas essas características sugerem que o processo de biomineralização e formação de magnetossomo nas BM tem um controle genético preciso (Bazylinski & Frankel, 2004).

Em um trabalho sobre genoma das BM, Richter *et al.*, 2007 analisou os genomas totais e parciais de BM da classe *Alphaproteobacteria* e observou a presença de uma região bastante conservada com a presença de genes importantes para a biomineralização, esses genes se organizam em quatro operons: *mamAB*, *mamGFDC*, *mam XY* e *mms6*) (Richter *et al.*, 2007). Essa região em que esses operons se concentram é denominada ilha do magnetossomo (em inglês MAI- *Magnetosome island*), esse nome se dá devido as similaridades encontradas com as ilhas de patogenicidade encontradas em diversas espécies de bactérias patogênicas. (Richter *et al.*, 2007).

Em um estudo de Murat *et al.* (2010), no qual diversas regiões da MAI da BM *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1 foram deletadas para se observar sua consequência na biomineralização dos cristais de magnetossomos, foi notado que ao se deletar o operon *mamAB* não havia formação da MM e dos cristais nas BM mutantes, isso sugere que o operon *mamAB* possui genes relacionados com a formação da MM e da biomineralização dos magnetossomos (Murat *et al.* 2010). Alguns dos genes encontrados nesse operon (genes *mamK*, *M*, *O*, *P*, *Q* e *B*) são encontrados em todas as bactérias magnetotáticas já estudadas até o momento (Lohbe *et al.*, 2011; Lefèvre *et al.*, 2013).

O operon *mamGFDC* é conhecido por sua influência na formação e no controle de crescimento dos magnetossomos em BM (Lefèvre *et al.*, 2013). Apesar de alguns estudos demonstrarem que os magnetossomos continuam se formando mesmo na ausência desses genes em BM, os cristais formados nas BM mutantes são consideravelmente menores que na BM selvagem e isso mostra que apesar de não ser essencial, quando presente, esses genes ajudam a controlar o crescimento dos magnetossomos (Faivre & Schuler, 2008). As

diferenças entre os magnetossomos de diferentes espécies e a diversidade dos cristais, pode ser explicado pelas diferenças nas MAI entre espécies de BM diferentes (Lefèvre *et al.*, 2013).

A organização desses magnetossomos em uma ou mais cadeias também é controlada geneticamente e essas cadeias tendem a se localizar no centro das células das BM e os cristais em crescimento tendem a ficar no fim de cadeias. (Faivre and Schuller, 2008). Estudos já demonstraram a importância das proteínas MamK e MamJ no alinhamento dessas cadeias, onde BM mutantes sem a presença dos genes que expressam essas proteínas, não conseguem formar esse alinhamento em cadeias que é essencial para permitir a bactéria se orientar com o CGM. (Faivre & Schuler, 2008).

As BMs são sensíveis a concentrações atmosféricas de O₂ presentes na superfície (são microaerófilas e/ou anaeróbias). Por isso, as BMs buscam uma zona ideal para crescimento que é próximo ou dentro das regiões de interface óxica-anóxica (em inglês *oxic-anoxic interface* – OAI), nessa região se tem as condições ideais de O₂ e outros nutrientes para as BMs, sendo essencial para sobrevivência delas encontrarem e se manter nessas zonas. Com isso, a magnetotaxia associada à quimiotaxia é essencial para BMs encontrarem rapidamente essas regiões de interface óxica-anóxica. (Bazylnski & Frankel, 2004; Simmons *et al.*, 2004; Komeili, 2011).

Devido à sensibilidade ao O₂ e a necessidade de gradientes específicos de ferro e enxofre, há uma grande dificuldade de isolamento de BM em cultura pura (Bazylnski & Frankel, 2004). Com essa complexidade de seu habitat e pouco conhecimento sobre seu metabolismo, é extremamente difícil simular em laboratório as mesmas condições, levando a presença de poucas BMs cultiváveis, sendo a grande maioria de BMs não cultiváveis e os estudos das BM não cultiváveis são realizados através de técnicas independentes de cultura. (Faivre & Schuler, 2008; Morillo *et al.*, 2014).

1.2.2. Magnetotaxia

Como foi mostrado anteriormente, a magnetotaxia é um fenômeno comum a todas as BMs, composto pela orientação passiva das células em relação as linhas do campo magnético somada ao sentido de rotação dos seus flagelos (Frankel *et al.*, 1997). Originalmente, dois tipos de magnetotaxia são descritos: a magnetotaxia axial, ela ocorre principalmente nos magnetospirilos, migrando nas duas direções ao longo das linhas do campo magnético, com ocasionais reversões espontâneas de direção de nado e a magnetotaxia polar, mais comum

entre as BMs e apresentada principalmente por cocos, a bactéria nada persistentemente em uma direção ao longo das linhas do campo magnético sob condições óxicas, invertendo o sentido sob condições anóxicas (Spormann & Wolfe, 1984; Frankel *et al.*, 1997). Tal característica permite às bactérias nadarem em direção à interface óxica-anóxica (em inglês *oxic-anoxic interface* – OAI) da coluna d'água ou sedimento, uma vez que as linhas do campo magnético terrestre possuem uma inclinação diagonal em relação ao eixo de rotação da terra e quase paralela ao gradiente de oxigênio desses ambientes (Frankel *et al.*, 1997; Lefèvre *et al.*, 2013). Com base na direção que as BMs nadam preferencialmente sob condições óxicas, elas podem ser classificadas (Figura 4) em Tipo Sul (TS ou SS- do inglês *South seeking*) que são as BM que nadam em direção ao polo sul geográfico (norte magnético), e em Tipo Norte (TN ou NS- do inglês *Norte seeking*) que são as BM que nadam em direção ao polo norte geográfico (sul magnético). Na região do Equador magnético já foram observadas populações com concentrações aparentemente semelhantes de BMs tipo Sul e tipo Norte. (Blakemore, Frankel & Kalmijin, 1980; Simmons *et al.*, 2006).

Atualmente são descritos três tipos de magnetotaxia: axial, dipolar (anteriormente chamada de polar) e unipolar (Lefèvre *et al.*, 2014). Nesse caso, o conceito de magnetotaxia axial e dipolar permanecem os mesmos. Já a magnetotaxia unipolar, pode ser dividida entre as bactérias com comportamento unipolar direcionado para zonas óxicas e zonas anóxicas (Lefèvre *et al.*, 2014). As bactérias com comportamento unipolar direcionado para zonas anóxicas levarão em conta o gradiente de oxigênio no lado óxico e a direção do campo magnético no lado anóxico para reverter a sua direção de nado e o inverso acontece para as BMs com comportamento unipolar para zona óxica. Dessa forma, a magnetotaxia unipolar se diferencia da dipolar já que possui uma polaridade preferencial, óxica ou anóxica, enquanto as dipolares não possuem preferência na polaridade (Lefèvre *et al.*, 2014).

O modelo clássico que explica a magnetotaxia é baseado em células alongadas como espirilos, vibriões e bacilos e nesse modelo essas bactérias possuem a cadeia de magnetossomos alinhadas ao longo do eixo maior da célula, do eixo natatório e às linhas do CGM (Spormann & Wolfe, 1984; Frankel *et al.*, 1997). Elas estão em busca da região de IOA (Figura 5) e quando estão acima dessa região, se encontram num estado oxidado e em busca de um ambiente redutor, neste estado seus flagelos rotacionam no sentido anti-horário fazendo com que a célula se desloque em direção ao sedimento e conseqüentemente alcance a região de IOA. Quando essas bactérias se encontram abaixo desta região, elas estão num estado reduzido e em busca de um ambiente mais oxidado, dessa forma, seus flagelos rotacionam no

região de IOA, isto ocorre sentido horário fazendo com que a célula se desloque em direção a superfície e alcance a tanto para as bactérias no hemisfério sul quanto no hemisfério norte (Frankel *et al.*, 1997).

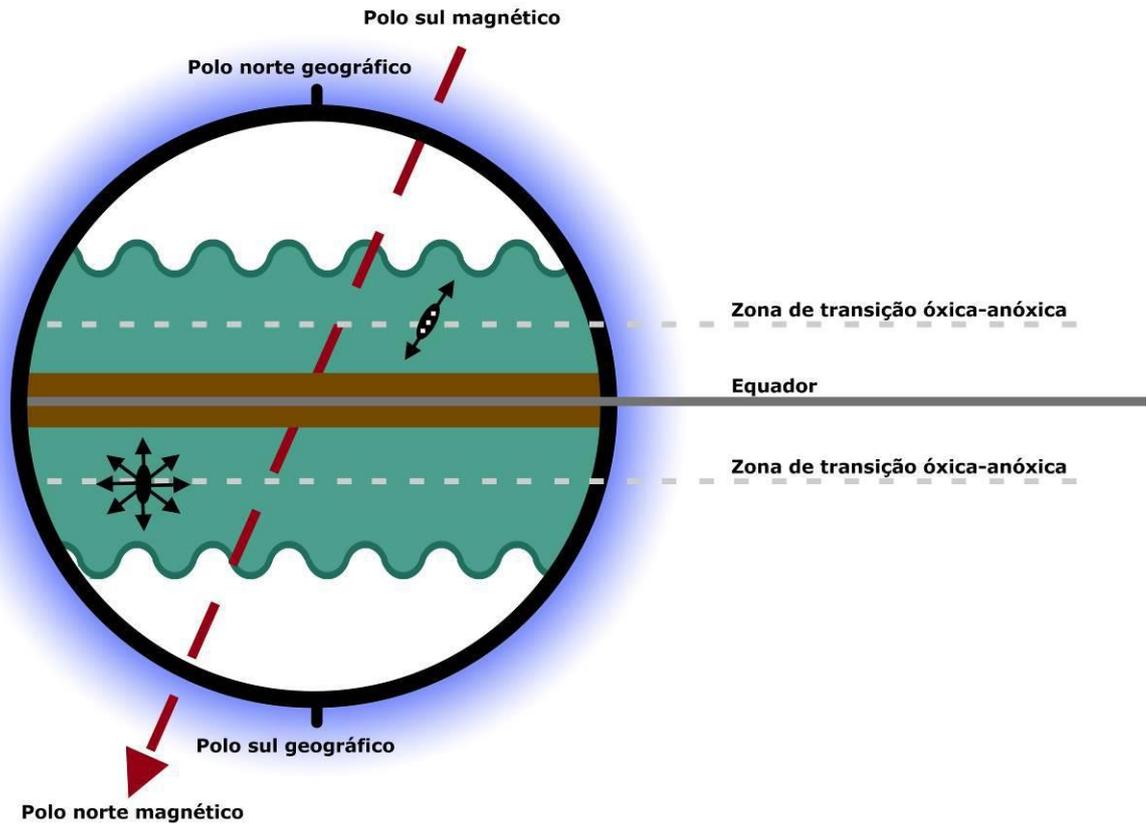


Figura 4: Ilustração mostrando BM alinhada ao CGM buscando a zona de IOA. As BMs estão sempre em busca da zona de IOA nadando paralelamente ou antiparalelamente a linha do CGM, as BMs do tipo norte se encontram predominantemente no Hemisfério Norte e nadam em direção ao sul magnético (Norte geográfico), enquanto as bactérias do tipo sul se encontram predominantemente no Hemisfério Sul e nadam em direção ao norte magnético (Sul geográfico).

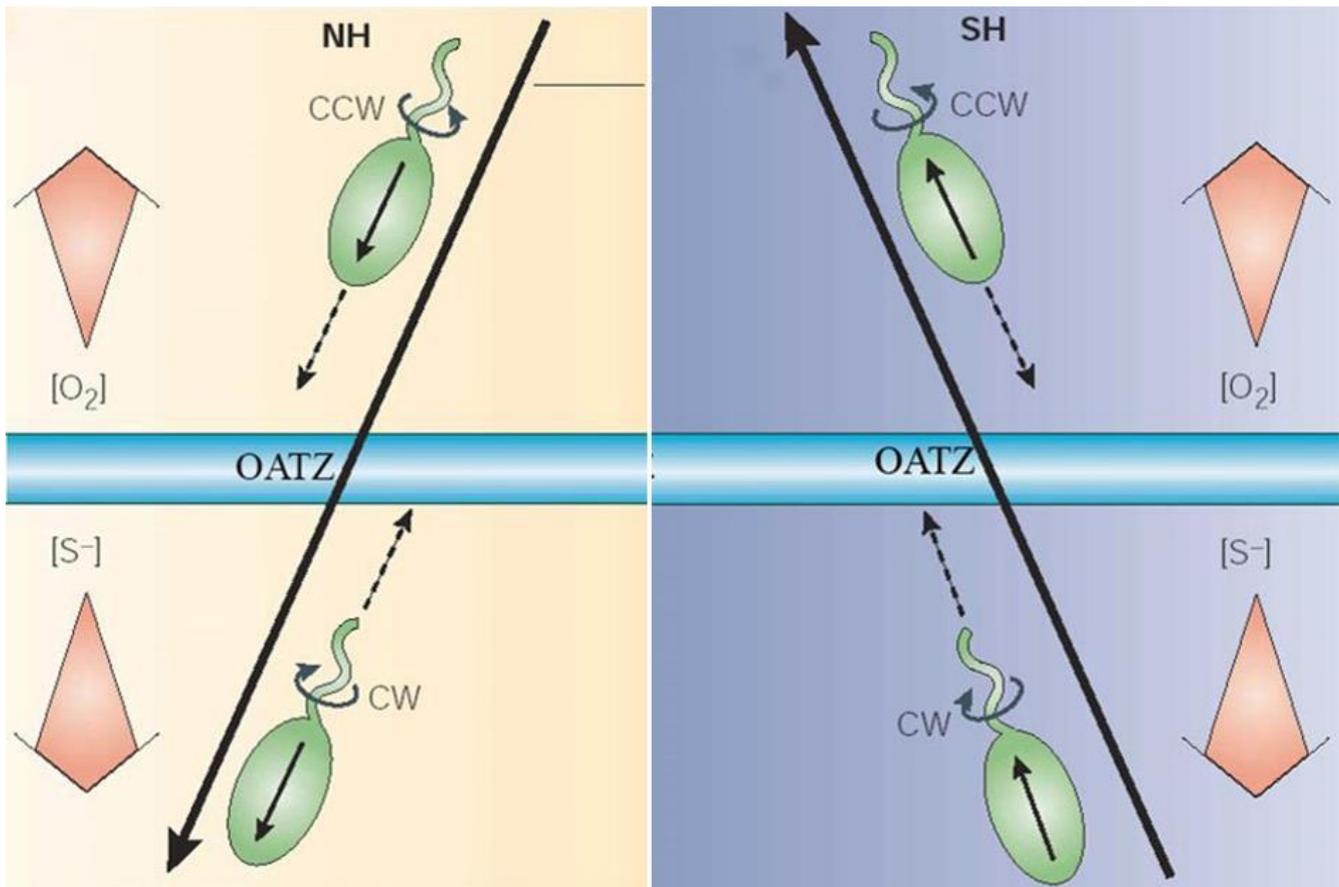


Figura 5: Modelo clássico de magnetotaxia. Neste modelo, é possível observar como funciona a magnetotaxia em BMs do hemisfério norte e hemisfério sul. Mostrando o sentido em que os flagelos rotacionam de acordo com o estado em que a bactéria se encontra, oxidado ou reduzido, dessa forma fazendo com que a bactéria alcance a região de IOA. Fonte: acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia.

Ambos os tipos de magnetotaxia trabalham em conjunto com várias formas de quimiotaxia (e.g., aerotaxia) para as BMs eficientemente encontrarem e manterem uma posição ideal em relação a disponibilidade de nutrientes, em habitats aquáticos com gradientes químicos verticais, reduzindo um problema de busca tridimensional para uma única dimensão (Frankel *et al.*, 1997, 2007).

1.3.1. *Magnetofaba australis* cepa IT-1

A bactéria magnetotática *Magnetofaba australis* cepa IT-1 (Figura 6) é um coco magnetotático filogeneticamente afiliado à classe Alphaproteobacteria isolado da lagoa em

Itaipu, litoral de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil (Morillo *et al.*, 2014). Ela apresenta morfologia cocóide com uma região côncava e uma região convexa que lhe dá uma aparência parecida com a de um feijão (Morillo *et al.*, 2014). Os magnetossomos são de magnetita (Fe_3O_4), e apresentam morfologia de cuboctaedro alongado, formando uma cadeia de 10 ± 3 magnetossomos por célula. São observadas inclusões intracelulares de fósforo ou enxofre, e o tamanho de cada célula varia em média entre $1,4 \pm 0,3 \times 1,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Morillo *et al.*, 2014). Esta bactéria apresenta dois tufos de flagelos lofotríqueos, cada tufo com sete flagelos, que estão alojados em bolsas na superfície celular da parte côncava da célula (Morillo *et al.*, 2014). Sua trajetória e velocidade de nado a difere de outras bactérias com morfologia semelhante a feijão, que apresentam trajetória de nado helicoidal e velocidades que variam entre 45 e $160 \mu\text{m.s}^{-1}$ (Zhang *et al.*, 2012b), uma vez que apresenta trajetória de nado retilínea e uma velocidade de nado máxima alta podendo chegar a $300 \mu\text{m.s}^{-1}$. Além disso, a *Mf. australis* cepa IT-1 aparenta nadar com a superfície côncava a frente o que sugere que os flagelos rotacionam à frente da célula (Morillo *et al.*, 2014).

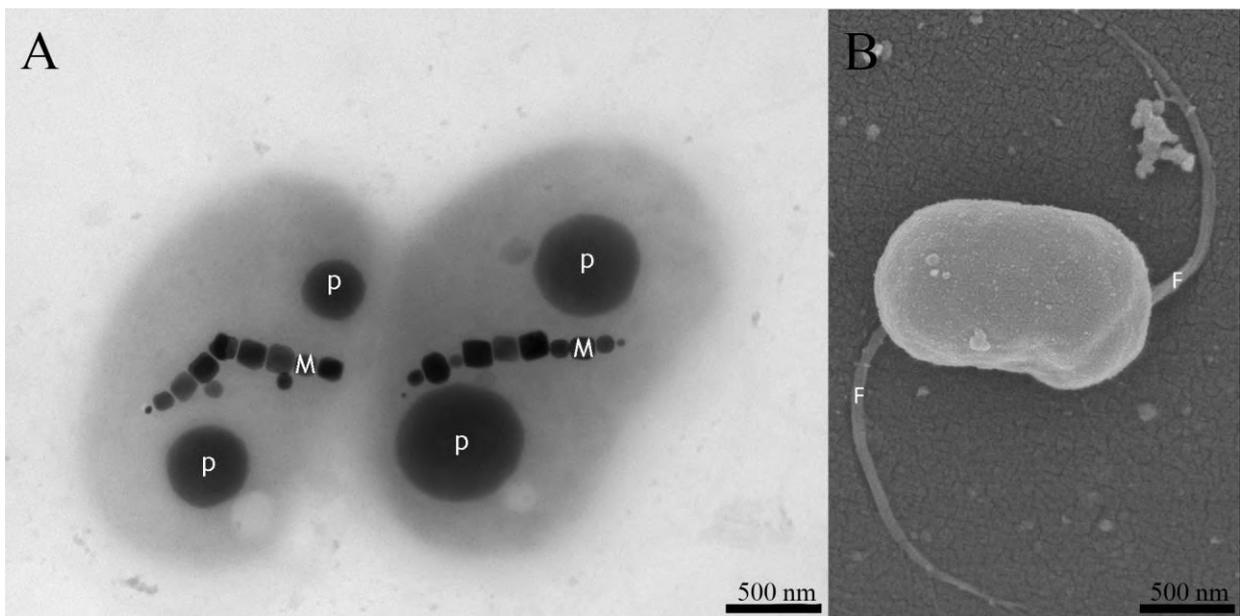


Figura 6: Morfologia e ultraestrutura da bactéria *Mf. australis* cepa IT-1. (A) é observado em microscopia eletrônica de transmissão a cadeia única de magnetossomos (M) em cada célula e as inclusões ricas em fósforo (P). (B) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de *Mf. australis* cepa IT-1 onde se pode observar a morfologia semelhante a um feijão (B) e os dois tufos de flagelos. (F). Fonte: acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia.

Dessa forma, a *Mf. australis* cepa IT-1 não se encaixa no modelo clássico de magnetotaxia mostrando anteriormente já que a cadeia de magnetossomos está aparentemente

desalinhada com o eixo natatório (figura 7) e a simples rotação dos flagelos desalinhará a célula em relação ao CGM (Araújo *et al.*, 2016).

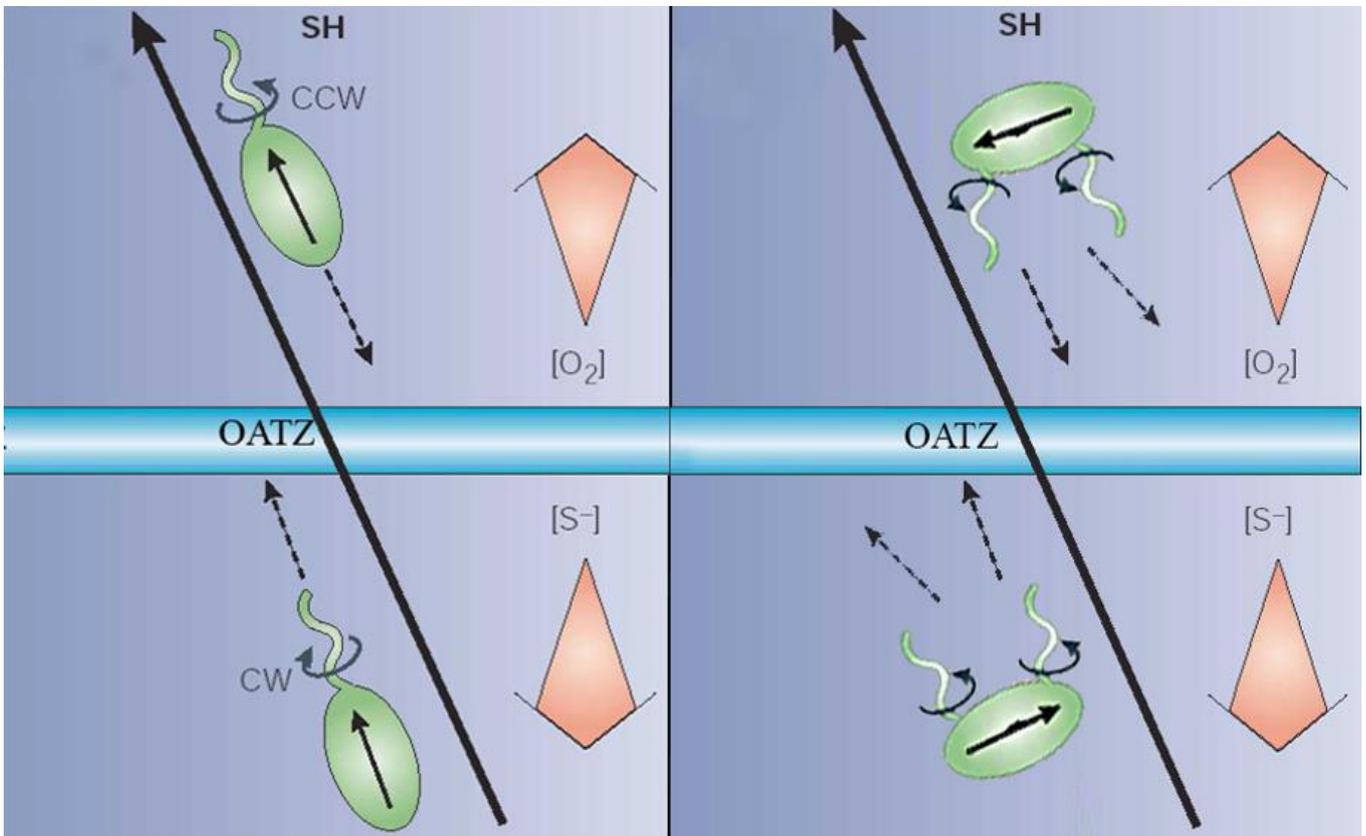


Figura 7. Comparação da *Mf. australis* cepa IT-1 mostrando diferenças com o modelo clássico de magnetotaxia. Nele é possível observar divergências com o modelo clássico, onde a cadeia de magnetossomos é alinhada ao eixo natatório e consequentemente às linhas do CGM. Na *Mf. australis* cepa IT-1 essa cadeia aparentemente não se encontra alinhada ao eixo natatório e diferente da maioria das bactérias, o flagelo ‘puxa’ a célula na direção de deslocamento em vez de ‘empurrar’ como é na maioria das bactérias. Fonte: acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia.

Nesse mesmo estudo, Araújo *et al.*, (2016) observando a motilidade da *Mf. australis* cepa IT-1 em microscopia de campo escuro utilizando uma câmera CCD foi visto que a bactéria apresenta uma aparente trajetória helicoidal (figura 8 A) entretanto quando esse mesmo movimento foi observado utilizando câmeras de alta velocidade (500 a 1000 fps) se observou que a trajetória da *Mf. australis* cepa IT-1 era retilínea e a célula se desloca rotacionando no próprio eixo (figura 8 B), diferente do observado inicialmente (Araújo *et al.*, 2016).

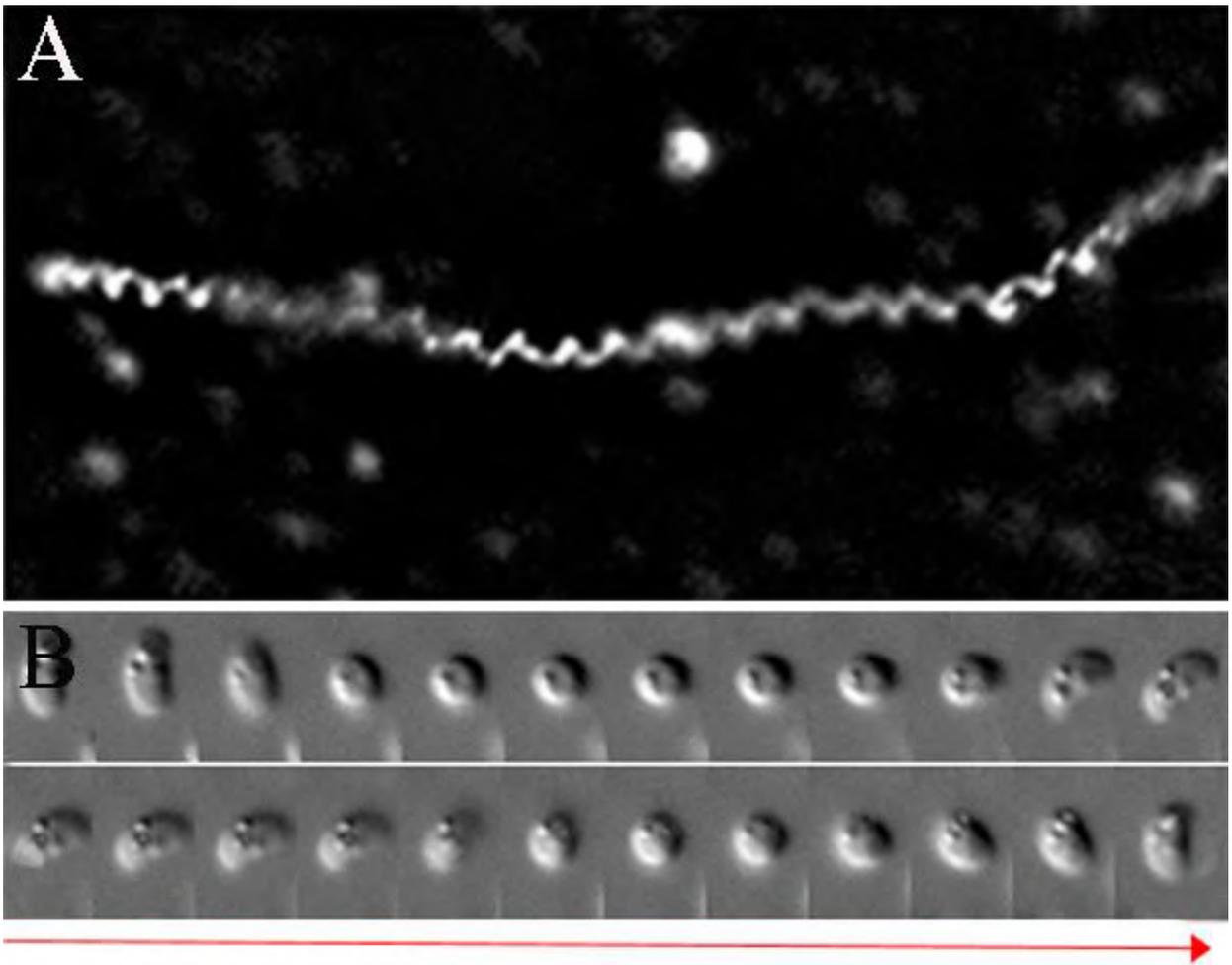


Figura 8: Imagem mostrando a trajetória de deslocamento da *Mf. australis* cepa IT-1 quando observada em microscopia de campo escuro com uma câmera CCD e em DIC utilizando câmeras de alta velocidade. Em microscopia de campo escuro, foi observado que a célula possuía uma trajetória aparentemente helicoidal (A), mas quando observado em DIC, com uma câmera de alta velocidade, foi observado que a trajetória era retilínea e aparentemente a célula rotacionava no próprio eixo ao se deslocar alinhada às linhas do CGM (B). Fonte: modificado de Araújo *et al.*, 2016.

Mf. australis cepa IT-1 possui magnetotaxia polar e a maioria da população nada na direção do sul geográfico sendo classificadas como tipo sul (TS), é a primeira bactéria magnetotática a ser isolada no hemisfério Sul em cultura axênica e a primeira BM cocóide descrita que produz magnetossomos cuboctaédricos alongados, além de possuir o genoma parcial sequenciado, o que inclui os genes responsáveis pela biomineralização do magnetossomo (Morillo *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

A magnetotaxia é explicada com base em células alongadas, como espirilos, vibriões e bacilos, que possuem a cadeia de magnetossomos alinhadas ao longo do maior eixo da célula, sendo também esse eixo coincidente ao posicionamento dos flagelos e eixo natatório da bactéria. *Mf. australis* cepa IT-1 possui características que a difere dessas bactérias magnetotáticas, inclusive dos outros cocos magnetotáticos, como seu formato característico com uma região côncava e outra convexa e o fato de os tufo de flagelos “puxarem” a célula e não “empurrarem”. Assim, os flagelos estão dispostos à frente da célula durante a locomoção em determinada direção. Além disso, a descrição feita por Araújo *et al.* (2016) sugere que a cadeia de magnetossomos está alinhada quase que perpendicular ao eixo natatório. No entanto, não foi realizada reconstrução da célula para confirmação dessa informação. A relação entre a ultraestrutura e a motilidade de BMs é pouco abordada na literatura. No entanto, é essencial para a compreensão da magnetotaxia, uma vez que possibilita o entendimento sobre a orientação dos magnetossomos na célula e dessa em relação ao campo magnético e a motilidade natatória. Esse trabalho visa o estudo da relação entre componentes estruturais da célula e sua relação com a motilidade da bactéria magnetotática *Mf. australis* cepa IT-1.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desta monografia é caracterizar a ultraestrutura bactéria *Mf. australis* cepa IT-1, principalmente no que diz respeito à posição dos flagelos e organização dos magnetossomos na célula e correlacionar com orientação da célula em campo magnético aplicado e sua motilidade natatória.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a ultraestrutura de *Mf. australis* cepa IT-1 utilizando métodos de congelamento rápido, substituição a frio e ultramicrotomia.

- Obter um modelo tridimensional da célula de *Mf. australis* cepa IT-1 através de cortes seriados e microscopia eletrônica de transmissão.
- Determinar as relações espaciais entre a cadeia de magnetossomos e o aparato flagelar e sua influência no movimento em *Mf. australis* cepa IT-1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultivo da bactéria magnetotática *Mf. australis* cepa IT-1

A cultura de *Mf. australis* cepa IT-1 utilizada neste trabalho foi obtida na coleção de culturas do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia (LabMax). O cultivo foi feito em meio semissólido heterotrófico com gradiente de O₂ (Tabela 1), no qual em 100 ml é constituído por: 100 ml de água do mar artificial (Tabela 2) (ASW – do inglês *Artificial Sea Water*), 0,024g de cloreto de amônio (NH₄Cl), 0,3 g de HEPES, 0,128 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 0,1 g de acetato de sódio (C₂H₃NaO₂), 0,1g de succinato de sódio, 0,052 g de cisteína-HCL, 0,15 g de bacto-ágar e 0,02 ml de resazurina a 0,2% que é um indicador redox. Após a adição da resazurina, o meio foi autoclavado a 121° C por 30 minutos para esterilização.

Depois da esterilização, foi colocado 0,4 ml de K₂HPO₄ a 1,86%, 0,3 ml de tiosulfato de sódio a 40%, e 0,5 ml de solução de minerais Wolf estéril (Frankel, 1997). Após a adição da solução de minerais, o pH foi ajustado para 7,2. Então foi adicionado ao meio 0,2 ml de quinato férrico (0,01M) e 0,05 ml de solução de vitaminas. Em seguida o meio foi distribuído para tubos de ensaios sendo deixados em repouso até a formação do gradiente de O₂. Após a formação do gradiente, 20 µl de uma cultura de *Mf. australis* cepa IT-1 foi inoculada na interface óxica-anóxica (IOA) do meio, sendo mantido numa estufa a 28°C por 15 dias.

Tabela 1: Composição do meio heterotrófico semissólido com gradiente de O₂ para *Mf. australis* cepa IT-1.

COMPONENTE DO MEIO	QUANTIDADE
Água do mar artificial (ASW)	q.s.p 100 ml
Cloreto de amônio	0,024 g
Hepes	0,3 g
Bicarbonato de sódio	0,128 g
Acetato de sódio	0,1 g
Succinato de sódio	0,1 g
Cisteína-HCl	0,052g
Bacto-ágar	0,15 g
Resazurina (0,2%)	0,02 ml
APÓS AUTOCLAVAR A 121 ° C POR 30 MINUTOS	
Fosfato de potássio dibásico (1,86%)	0,4 ml
Tiosulfato de sódio (40%)	0,3 ml
Solução de minerais Wolf (estéril)	0,5 ml
AJUSTAR pH EM 7,2	
Quinato férrico (0,01M)	0,2 ml
Solução de vitaminas	0,05 ml

Tabela 2: Composição de ASW – Usada no meio semissólido heterotrófico para *Mf. australis* cepa IT-1.

COMPONENTE DO MEIO	QUANTIDADE
H ₂ O Miliq	q.s.p 1L
Cloreto de sódio	16.4 g
Cloreto de magnésio. 6 H ₂ O	3.5 g
Sulfato de sódio	2.8 g
Cloreto de cálcio. 2 H ₂ O	1 g
KCl	0,5 g

4.2. Manutenção e observação das culturas de *Mf. australis* cepa IT-1

A observação da viabilidade das células no meio, sua resposta magnetotática e a constatação de que não havia contaminações foram feitas através da técnica de gota pendente (Schüler, 2002) utilizando o microscópio de luz Zeiss AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) no modo de contraste interferencial diferencial de Normanski (DIC), usando uma objetiva de 100x e a câmera digital Zeiss AxioCam MR A10 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). As células foram concentradas na borda da gota usando um ímã de neodímio ferro boro, permitindo observar sua resposta magnetotática e a viabilidade celular das células na cultura. Constatado a viabilidade celular e ausência de contaminação, essa cultura foi utilizada para a passagem para um novo meio e demais experimentos.

4.3. Congelamento por alta pressão (High Pressure Freezing)

Em meio semissólido contendo gradiente de oxigênio, as células crescem formando uma banda na região que contém a concentração ideal de oxigênio de acordo com seus requerimentos metabólicos. Assim, a banda contendo *Mf. australis* cepa IT-1 foi retirada do meio de cultura heterotrófico semissólido, transferida para tubo de polipropileno, diluída em água de mar artificial e concentrada magneticamente utilizando um ímã. O concentrado de células foi congelado por alta pressão utilizando o aparelho Leica HPM 100 equipado com um sistema de transferência rápida (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA).

4.4. Substituição a frio

Após essas células serem previamente congeladas por alta pressão, estas foram contrastadas e incluídas através do método de substituição a frio. Foi utilizado um meio de transferência que consiste de acetona anidra, tetróxido de ósmio 2 % e acetato de uranila 0,1 % e durante a substituição a frio as amostras foram mantidas a -90 °C por 90 h, a -35°C por 4 h e a -20° C por 2 h (Morillo *et al.*, 2014). Depois disso, a temperatura foi aumentada gradualmente até alcançar a temperatura ambiente sendo essas amostras incluídas utilizando resina epóxi e polimerizadas durante 72 h a 60°C gerando diversos blocos de resina com a amostra incluída (Morillo *et al.*, 2014).

4.5. Ultramicrotomia e obtenção de cortes seriados

Primeiramente foi feita a análise dos blocos de resinas gerados durante a substituição a frio com o intuito de saber se o processo de fixação ocorreu corretamente e se esses blocos

estavam com qualidade para serem aproveitados. A obtenção de cortes ultrafinos dos blocos foi feita usando o ultramicrotomo Leica EM U6. Em seguida, os cortes ultrafinos gerados foram colocados em grades de cobre (300 mesh) (*Electron Microscopy Sciences, US*) e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Morillo *et al.*, 2014). A partir dos blocos selecionados foram feitos cortes em série, com espessura de 60 nm cada, os cortes seriados foram então recolhidos usando uma grade de cobre com fenda (*Electron Microscopy Sciences, US*) revestida com formvar. Essas grades foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (Morillo *et al.*, 2014).

4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A observação inicial para determinação dos blocos nos quais as células estavam mais bem preservadas foi feita no microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni (*FEI Company, Hillsboro, OR*), com voltagem de aceleração de 80 kV com a finalidade de selecionar os melhores blocos para obtenção dos cortes seriados para reconstrução tridimensional. A observação dos cortes seriados foi feita utilizando o microscópio FEI TECNAI SPIRIT (*FEI Company, Hillsboro, OR*) a 120 kV. Foram adquiridas imagens de células bem preservadas que apareceram na sequência de cortes seriados. Essas imagens foram utilizadas na reconstrução tridimensional.

4.7. Reconstrução com modelo 3D

As imagens obtidas foram alinhadas e foi criado o modelo tridimensional da *Mf. australis* Cepa IT-1 utilizando o programa IMOD 4.9 e programas associados ao pacote do IMOD 4.9 como o 3DMOD.

5. RESULTADOS

5.1. Características das culturas *Mf. australis* cepa IT-1

A observação das células por microscopia óptica durante o cultivo em laboratório mostrou que as células apresentaram o comportamento magnetotático tipo Sul e a característica morfológica evidenciada pelo formato de fava (Figura 9). Não foram observadas contaminações. Depois de três dias após o inóculo, já era possível observar a banda de crescimento em região do tubo correspondente a interface óxica-anóxica indicada pela resazurina. A banda de células se tornou mais espessa e com coloração escura após 15 dias de crescimento, quando atingiu a interface meio/ar. O espessamento e migração das células ao longo do gradiente de oxigênio ocorre devido ao aumento da população e, conseqüentemente, do consumo de oxigênio (Morillo, 2014).

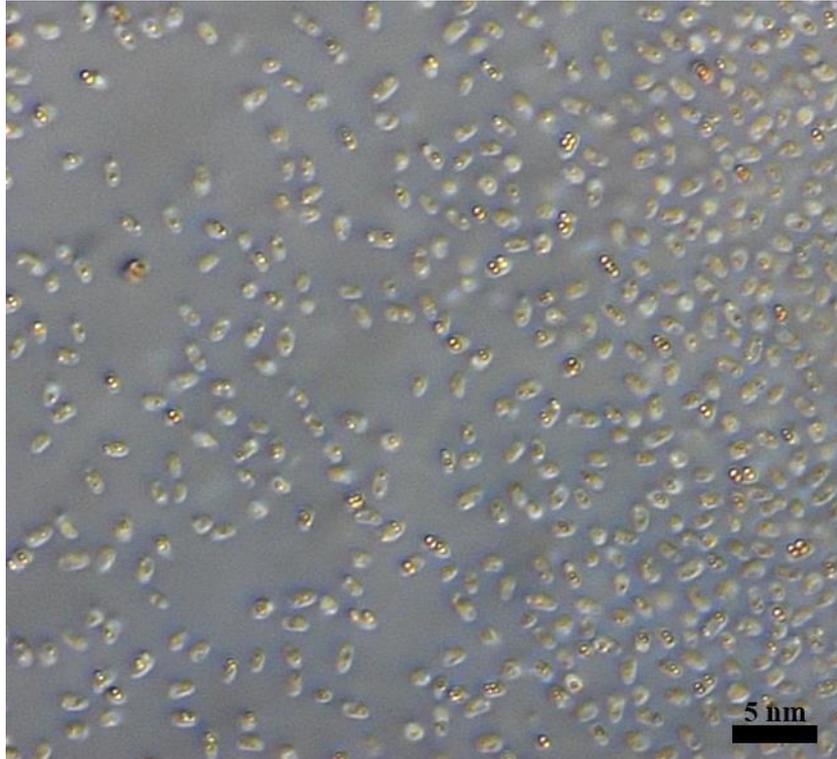


Figura 9: Característica morfológica da *Mf. australis* cepa IT-1. Imagem DIC mostrando morfologia cocóide/ovóide semelhante a uma fava.

5.2. Ultraestrutura de *Mf. australis* cepa IT-1

Os cortes ultrafinos obtidos após a utilização das técnicas de congelamento por alta pressão, substituição à frio e ultramicrotomia foram observados por MET e evidenciaram boa preservação da célula (Figura 10A). Foi possível notar que o citoplasma da célula apresentava turgidez, sem regiões vazias, que poderiam indicar a formação de cristal de gelo e/ou problemas na infiltração da resina. Além disso, a membrana da célula apresentava-se contínua e sem grandes ondulações (Figura 10B). Dessa forma, os resultados indicam que a criofixação e substituição a frio ocorreu de acordo com o esperado, garantindo a preservação da célula e suas estruturas.

As regiões de membrana estão nítidas nas micrografias, sendo possível diferenciar a membrana citoplasmática da região da parede Gram-negativa (membrana externa) (Figura 10B, setas brancas). Envolvendo a célula em sua região mais externa, foi notado uma camada amorfa que sugere a presença de uma fina cápsula, que se estende por toda superfície da célula (Figura 10A e 10B, setas pretas). Além disso é possível observar a presença de grânulos eletrondensos (Figura 10, indicado por “P”), cuja composição provavelmente é rica em fósforo, sendo provavelmente de polifosfato, como descrito por Morillo *et al.* (2014).

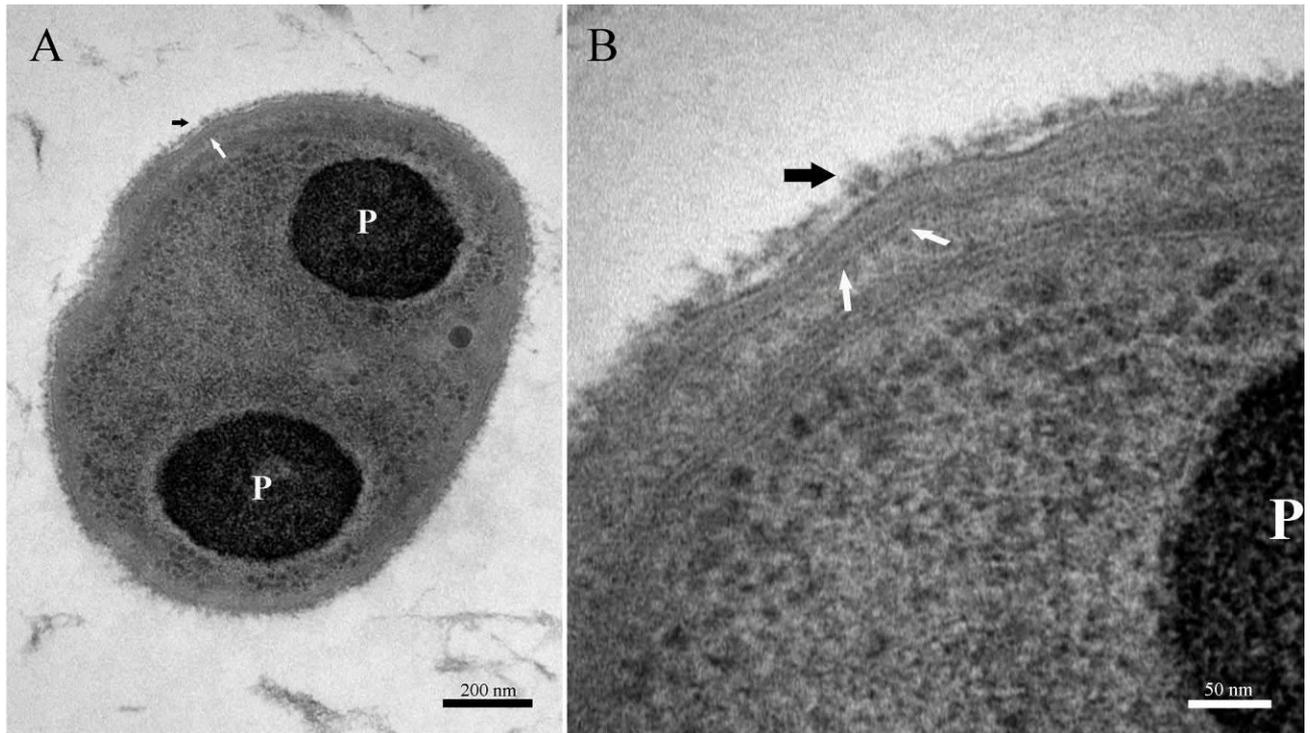


Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão de *Mf. australis* cepa IT-1 mostrando boa preservação da célula (A) e detalhe da parede e membrana celular (B). Note que a parede celular é do tipo Gram-negativa (setas brancas) e, em volta das células, a presença de uma fina cápsula (setas pretas).

Estruturas com aparência filamentosas semelhantes a arranjos de quimiorreceptores foram observadas (Figura 11A, setas brancas). No entanto, nesses cortes não era possível correlacioná-las à posição dos flagelos nas células. Note que na figura 11A existem duas dessas estruturas em regiões opostas na célula, próximas à membrana citoplasmática. As figuras 11B e C mostram essas estruturas em maior aumento. A presença de inclusões eletrolúcidas, as quais também já foram descritas em estudos anteriores, que se supõem serem constituídas de enxofre elementar, foram observadas (Figura 11B e E; indicado por "S"). As células de *Mf. Australis* cepa IT-1 observadas tinham apenas uma cadeia de magnetossomos de morfologia cuboctaédrica organizados em única cadeia e aparentemente na região convexa da célula (Figura 11D; asterisco branco). Em relação às estruturas de flagelos, foram observados tufo de flagelos saindo de bolsas flagelares presentes na superfície celular da bactéria (Figura 11E, ponta de seta branca). Em algumas células foi visto uma estrutura semelhante à uma capa que aparentemente cobre a região inicial do tufo de flagelos (figura 11D; ponta de seta preta).

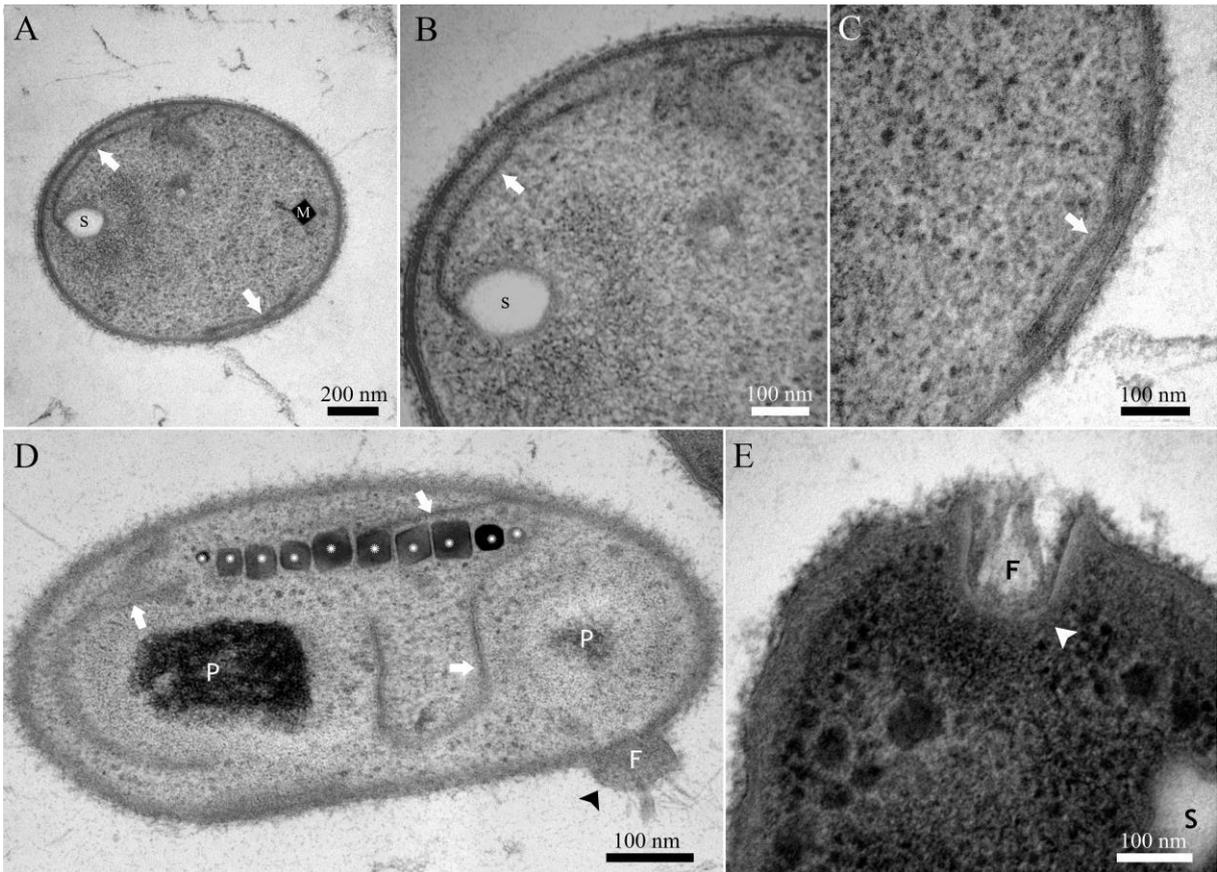


Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando detalhes da ultraestrutura da *Mf. australis* cepa IT-1. Nas imagens A, B e C é possível se observar estruturas filamentosas semelhantes à arranjos de quimiorreceptores em uma mesma célula (setas brancas), a presença de um grânulo eletróluscente (indicado por "S"). Na figura D é possível se observar a cadeia de magnetossomos (asteriscos brancos), as estruturas de quimiorreceptores (setas brancas) espalhadas por toda a célula, os flagelos (indicado por "F"), a estrutura observada cobrindo a parte inicial dos tufo de flagelos (ponta de seta preta) e os grânulos eletrondensos (indicados por "P"). Na figura E, é possível se observar a bolsa na superfície celular por onde os flagelos saem da célula (ponta de seta branca).

5.3. Reconstrução tridimensional de *Mf. australis* cepa IT-1

Foram adquiridas 17 imagens em série de uma mesma célula a partir da observação dos cortes seriados. Essas imagens foram alinhadas para possibilitar o delineamento de cada estrutura de interesse e gerar um modelo tridimensional da célula. Na figura 12 (A-E) podemos observar uma parte da série de imagens que foi utilizada na reconstrução tridimensional e o modelo tridimensional sobreposto a uma das imagens da série (Figura 12 G e H).

Com as imagens alinhadas, foi possível gerar o modelo tridimensional da célula e suas estruturas. O software 3DMOD foi usado para criação desse modelo, nele foram delimitados a membrana citoplasmática, estruturas filamentosas, grânulos ricos em fósforo, magnetossomos

e flagelos de cada uma das 17 imagens em séries alinhadas. Na figura 13 (A-D) é possível ver o modelo 3D gerado a partir das delimitações dessas estruturas celulares em diversos ângulos. Nota-se que os dois grânulos ricos em fósforo (Figura 13, estrutura em vermelho) estão presentes em polos opostos dentro da célula. A reconstrução das estruturas filamentosas semelhantes a arranjos de quimiorreceptores mostrou que elas são contínuas na célula, como um disco, e estão localizadas na região côncava da célula (Figura 13 A e B, estrutura em azul e em roxo). A estrutura filamentosa delineada em azul se concentra na região de um dos flagelos, com ramificações seguindo em direção a outro flagelo, onde foi observada a outra estrutura semelhante (Figura 13 A e B, estrutura em roxo). A reconstrução tridimensional da célula indica que os discos formados pelos filamentos delineados em azul e roxo estão muito próximos ou integrados, o que sugere que essas estruturas possam ser apenas uma estrutura maior em vez de duas diferentes (Figura 13 G, inserto). No modelo se observa dois flagelos (Figura 13 C e D, estruturas em amarelo) que surgem da superfície celular na parte côncava da célula e aparentam surgir em alturas diferentes da superfície celular, não aparentando estarem espacialmente simétricos em relação ao corpo celular. Os magnetossomos observados no modelo tinham morfologia cuboctaédrica e estavam dispostos espacialmente próximo a um polo da célula (Figura 13 C, estrutura em preto). Devido ao fato de os magnetossomos estarem apenas em uma imagem, quando a série de corte foi adquirida, a reconstrução tridimensional da célula no programa não reconheceu o volume correto dos magnetossomos, levando-os a serem visto no modelo de forma achatada. Na figura 13 C parece haver um desnível entre os dois magnetossomos mais à direita em relação ao resto da cadeia. Isso ocorre devido ao artefato mencionado anteriormente. Provavelmente a cadeia de magnetossomos está inclinada na célula e, por isso, os magnetossomos aparecem desnivelados. A reconstrução tridimensional a partir da eletrontomografia da célula em cada corte será utilizada futuramente para resolver essa questão. A estrutura mais próxima a cadeia de magnetossomos são os grânulos de enxofre (Figura 13, estrutura cinza), foram observados 3 grânulos de enxofre eletróluscentes que se encontravam distribuídos aparentemente de forma randômica pela região central e convexa da célula (Figura 13 A e C). A observação da posição da cadeia de magnetossomos em relação a cada tufo de flagelo indica que esses estão quase que perpendiculares, nessa situação, a estrutura utilizada para orientação ao longo das linhas do campo magnético não estaria alinhada paralelamente à direção de locomoção, como ocorre na maioria das BMs.

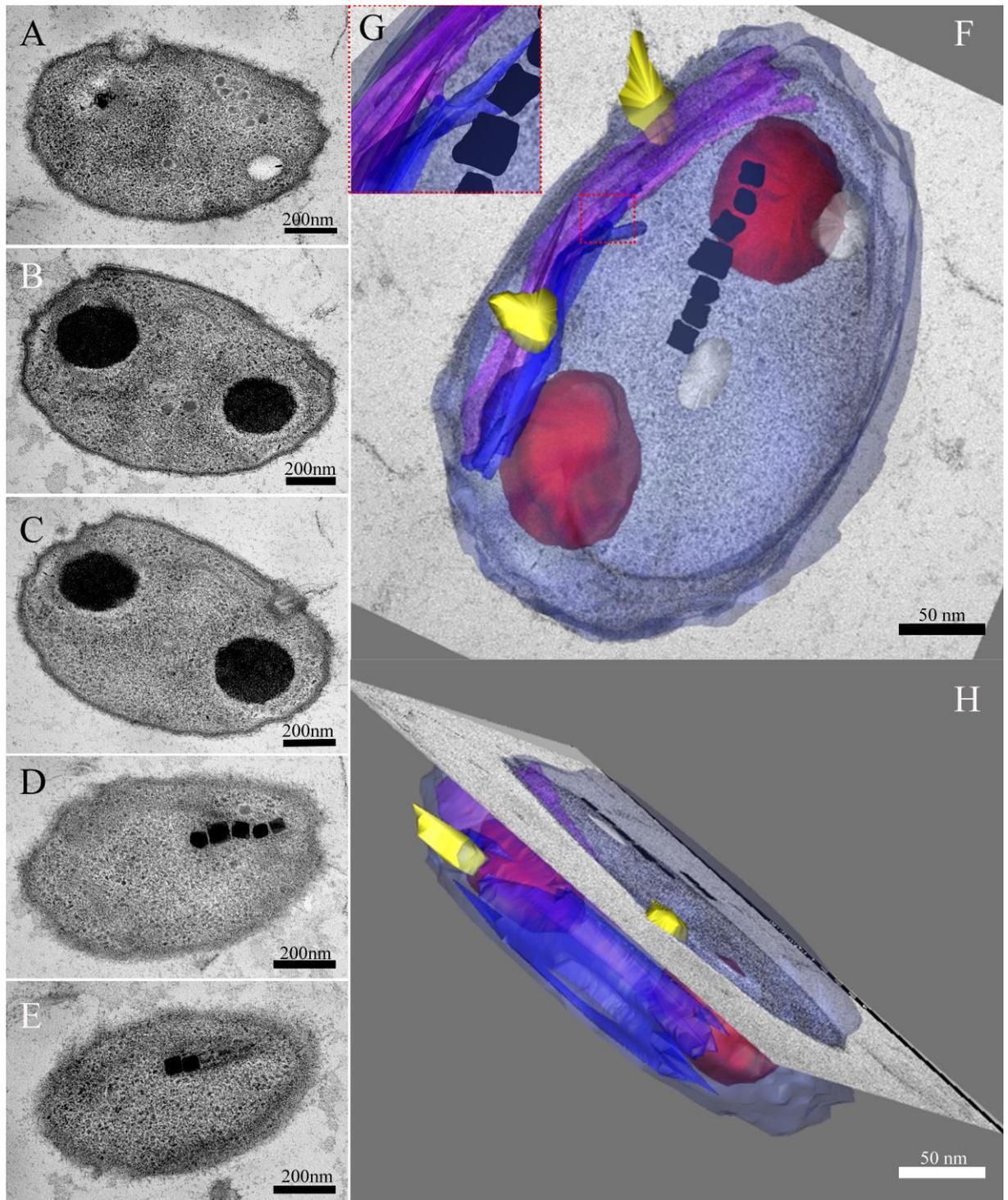


Figura 12: Reconstrução tridimensional de *Mf. australis* cepa IT-1 baseada em imagens obtidas a partir de cortes seriados. (A-E) Imagens adquiridas da mesma célula em cortes seriados por microscopia eletrônica de transmissão que foram utilizadas na reconstrução tridimensional da célula mostrando e suas principais estruturas (membrana citoplasmática, magnetossomos, grânulos ricos em fósforo e de enxofre, estruturas filamentosas semelhantes a quimiorreceptores e os flagelos). (G-H) Modelo tridimensional com a imagens de microscopia eletrônica de transmissão da seção correspondente da célula sobreposta. Nas figuras F e H é possível observar a sobreposição das imagens correspondentes às regiões de cada flagelo com o modelo tridimensional gerado e na figura G é possível observar um dos

pontos específicos nos quais aparentemente as duas estruturas filamentosas observadas parecem se unir. O inserto em (G) mostra em detalhe a região que está destacada pelo quadrado pontilhado vermelho.

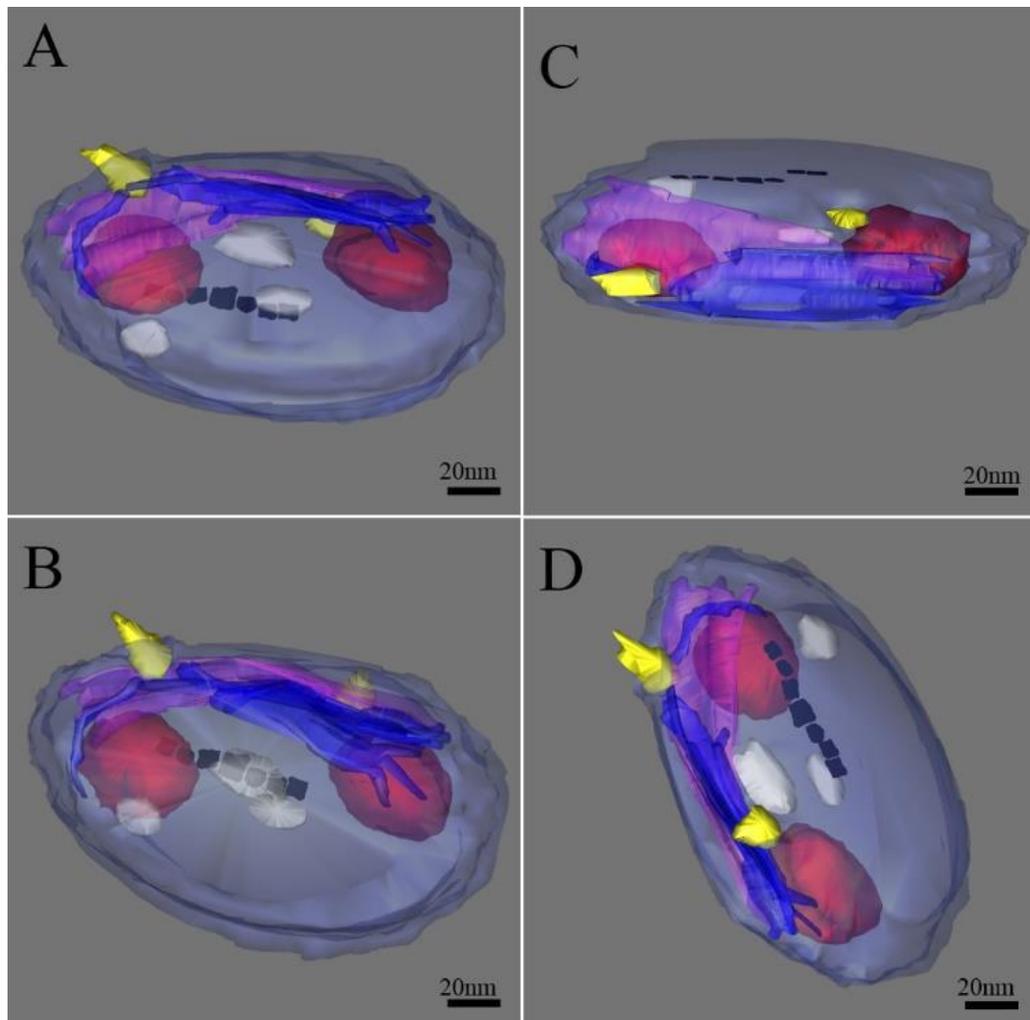


Figura 13: Modelo tridimensional da *Mf. australis* cepa IT-1 em diferentes ângulos. É possível ver nesta figura todas as estruturas delimitadas e vistas em diferentes ângulos como: magnetossomos (preto), grânulos ricos em fósforo (vermelho), grânulos de enxofre (cinza), flagelos (amarelo), estruturas filamentosas semelhantes a arranjos de quimiorreceptores (azul e roxo).

6. DISCUSSÃO

As BMs são sensíveis a concentrações atmosféricas de O₂, sendo em sua maioria, microaerófilas e/ou anaeróbias. Devido a essa sensibilidade, as BMs estão sempre buscando sua zona ideal para seu crescimento e sobrevivência que é dentro ou próximo das regiões de IOA, nessas regiões se tem as condições ideais de O₂ e outros nutrientes essenciais para essas bactérias. Com isso, é essencial que as BMs possuam meios de se locomover e achar essas regiões. Todas as BMs possuem a presença de magnetossomos, esses magnetossomos quando alinhados em cadeia dentro da célula permitem uma orientação da bactéria em relação ao CGM, essa orientação passiva mais a movimentação gerada pela rotação dos flagelos permite o fenômeno da magnetotaxia. A magnetotaxia junto com a quimiotaxia auxilia essas BMs a encontrar as regiões de IOA, sendo assim, a sua capacidade de se movimentar é essencial para uma resposta rápida a mudanças nessa região de IOA e para a sobrevivência dessas bactérias no ambiente. Os modelos que explicam a magnetotaxia não levam em consideração a posição das cadeias de magnetossomo na célula em relação à posição dos flagelos ou eixo natatório das bactérias não alongada sob campo magnético terrestre ou aplicado. A maior parte dos estudos desse tipo consideram apenas que a célula possui um momento magnético que foi convencionalmente estabelecido como a direção do nado quando as células são observadas ao microscópio óptico sob campo magnético aplicado. No caso do estudo de células alongadas, como bastonetes, espirilos e vibriões, nas quais a cadeia de magnetossomos, o eixo natatório e alinhamento da célula em relação ao campo magnético são aproximadamente paralelos, o entendimento da magnetotaxia parece mais direto. No entanto, em células redondas/ovais ou nas formas multicelulares que apresentam movimento de rotação, o alinhamento da célula em relação às linhas do campo magnético e sentido de locomoção não parece tão óbvio.

A bactéria *Mf. australis* cepa IT-1, foi a primeira BM do Hemisfério Sul isolada em cultura axênica e possui características marcantes que a destacam de outros cocos magnetotáticos (Morillo *et al.*, 2014). Morillo *et al.* (2014) as técnicas de congelamento por alta pressão e a substituição a frio para descrever aspectos celulares como a morfologia cocóide semelhante a um grão de feijão, essa morfologia é semelhante à bactérias não cultivadas descritas por Zhang *et al.* (2012a) que apresentam também essa morfologia e possuem 93% de similaridade genética com a *Mf. australis* mas possuem morfologia e outras características de seus magnetossomos diferentes (Morillo *et al.*, 2014). Por exemplo, a morfologia de cuboctaédrico alongado dos magnetossomos na *Mf. australis* cepa IT-1 não é comum em cocos magnetotáticos, com exceção da cepa MO-1 (Lefèvre *et al.*, 2009). Além

dessa morfologia diferente, os estudos de Morillo observaram que diferente das outras bactérias com morfologia semelhante a feijão descritas por Zhang *et al.* (2012a), *Mf. australis* atinge velocidades relativamente altas de nado, chegando até $300 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ e possuindo uma trajetória de nado linear, onde aparenta nadar com a face côncava da célula que possui os flagelos a frente, o que mostra que os flagelos rotacionam à frente da célula, puxando-a (Morillo *et al.*, 2014). A rápida velocidade, trajetória e eixo natatório de *Mf. australis* cepa IT-1 quando observadas por microscopia óptica em campo magnético aplicado pareciam conflitar com as observações da célula por MET que sugeriam que a cadeia de magnetossomos não estava alinhada paralelamente à direção de nado e às linhas do campo geomagnético, como na maioria das bactérias magnetotáticas. Nessa disposição de estruturas celulares, teoricamente se a cadeia de magnetossomos estivesse alinhada à direção de nado e às linhas do campo geomagnético, as células nadariam na direção perpendicular ao campo aplicado. Entretanto, isso não foi observado e a direção de nado de *Mf. australis* cepa IT-1 continuava alinhada às linhas do CGM e mantinha uma velocidade de nado alta, sendo assim necessário um estudo que observe mais detalhadamente a disposição espacial entre a cadeia de magnetossomos e os flagelos.

A observação por MET da ultraestrutura da *Mf. australis* cepa IT-1 usando os cortes seriados, mostrou a presença de estruturas, como os grânulos eletrondensos e eletronlucoscentes e a fina cápsula mais externa à célula que aparentemente cobre toda a bactéria. Duas estruturas distintas próximas aos flagelos, que aparentam ser arranjos de quimiorreceptores, foram observados assim como no estudo de Morillo *et al.* (2014). No entanto, através da reconstrução tridimensional, foi visto que essas estruturas se espalham por toda célula e em determinados pontos é possível observar que eles aparentemente se juntam o sugerindo que pode ser uma única estrutura. Estruturas semelhantes à quimiorreceptores que eram aparentemente filamentosas quando observadas em cortes ultrafinos, mas que apresentavam aspecto discoide se estendendo ao longo de uma região da célula próximas aos flagelos, também foram observadas em formas multicelulares de BMs (Abreu *et al.*, 2013; Leão *et al.*, 2017). O aparato flagelar em *Mf. australis* cepa IT-1 foi observado em bolsas na superfície celular na parte côncava da célula nos cortes celulares presentes. Em algumas células foram observadas estruturas semelhantes a uma capa ou bainha cobrindo o início dos tufo flagelares, essa estrutura não havia sido descrita antes e sua função é desconhecida. Entretanto, estruturas semelhantes a bainhas já foram descritas em outros cocos magnetotáticos, como *Mc. marinus* cepa MC-1 (Bazylnski *et al.*, 2013a) e cepa MO-1

(Lefèvre *et al.*, 2009), ambos possuem dois tufos flagelares bifolotríqueos com sete flagelos por tufo da mesma forma que a *Mf. australis* cepa IT-1. Essa estrutura não foi observada anteriormente no estudo de Morillo *et al.*, (2014). A observação de uma estrutura que aparenta ser um resquício de bainha nos flagelos neste trabalho levanta a suspeita de que *Mf. australis* cepa IT-1 aparentemente possui uma bainha da mesma forma que esses dois outros cocos magnetotáticos semelhantes. Por ser uma estrutura sensível, assim como os flagelos, possivelmente essa estrutura está sendo perdida durante o processamento da amostra. Isso pode ser um indicativo do porquê no estudo de Morillo *et al.*, (2014) não foi observada essa estrutura e o porquê neste trabalho essa estrutura foi notada apenas em algumas células. Em relação aos flagelos, eles aparentam surgir de pontos em planos diferentes entre si na superfície celular da parte côncava levando a uma sensação de que eles não saem de pontos simétricos em relação ao corpo celular. Os resultados indicam que o aparato flagelar nessas bactérias deve funcionar de forma diferente das BMs com morfologia de espirilo, bastonete e vibrião.

O modelo tridimensional gerado a partir dos cortes seriados também permitiu a visualização da disposição espacial da cadeia de magnetossomos em relação aos dois tufos de flagelos dessa bactéria. Foi observado que essa cadeia se encontra realmente, perpendicular e conseqüentemente desalinhada, em relação aos tufos de flagelos nessa bactéria. Isso confirma a suspeita que se tinha sobre esse desalinhamento nos estudos de Morillo *et al.* (2014).

Apesar de serem morfotipos de BMs totalmente distintos, as formas multicelulares e as células cocoides/ovoides apresentam como característica comum o não alinhamento das cadeias de magnetossomos às linhas do campo magnético e eixo natatório, sendo que esses últimos coincidem. Além disso, ambos os tipos celulares apresentam o movimento de rotação no eixo do "corpo" do microrganismo. Dessa forma, esse movimento deve ser o resultado do alinhamento da cadeia de magnetossomos em relação às linhas do campo magnético e do direcionamento natatório proporcionado pela quimiotaxia. Para elucidar essa questão seria necessário obter células de *Mf. australis* cepa IT-1 sem magnetossomos e comparar as características de movimento.

7. CONCLUSÕES

- As células observadas a partir de cortes finos obtidos após utilização de técnicas de congelamento por alta pressão, substituição a frio e ultramicrotomia estavam em ótimo estado de preservação e devido a isso foi possível caracterizar a ultraestrutura da bactéria magnetática *Mf. australis* cepa IT-1.
- A observação das células por MET mostrou a presença de uma estrutura envolvendo a parte inicial dos tufo de flagelos em algumas das células no corte seriado que não havia sido observada em estudos anteriores.
- A reconstrução tridimensional dos cortes seriados mostrou que as estruturas filamentosas semelhantes à arranjos de quimiorreceptores se estendem por uma região da célula próxima aos flagelos, formando um disco.
- O modelo confirmou a suspeita entre as relações espaciais da cadeia de magnetossomo com o aparato flagelar mostrando que ela está aproximadamente perpendicular e conseqüentemente desalinhada em relação as linhas de campo magnético e eixo natatório.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abreu, F., Silva, K. T., Leão, P., Guedes, I. A., Keim, C. N., Farina, M., & 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.
- Araujo, A. C. V., Morillo, V., Cypriano, J., Teixeira, L. C. R. S., Leão, P., Lyra, S., de Almeida, L.G., Bazyliński, D. A., de Vasconcelos, A.T.R., Abreu, F. & Lins, U. (2016). Combined genomic and structural analyses of a cultured magnetotactic bacterium reveals its niche adaptation to a dynamic environment. *BMC genomics*, 17(8), 726.
- Bazyliński, D. A., Frankel, R. B., Heywood, B. R., Mann, S., King, J. W., Donaghay, P. L., & Hanson, A. K. (1995). Controlled Biomineralization of Magnetite (Fe (inf3) O (inf4)) and Greigite (Fe (inf3) S (inf4)) in a Magnetotactic Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3232-3239.
- Bazyliński, D. A., & Frankel, R. B. (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 217-230.
- Bazyliński, D. A., Williams, T.J., Lefèvre, C.T., Berg, R.J., Zhang, C.L., Bowser, S.S., Dean, A.J., & 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 801-808.
- Bellini, S. (1963a). Su di un particolare comportamento di batteri d'acqua dolce. Istituto di Microbiologia dell'Università di Pavia.
- Bellini, S. (1963b). Ulteriori Studi Sui "Batteri Magnetosensibili.". Salvatore Istituto di Microbiologia dell'Università di Pavia.
- Bellini, S. (2009). On a unique behavior of freshwater bacteria. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27(1), 3-5.
- Blakemore, R. P. (1975). Magnetotactic bacteria. *Science*, 190(4212), 377-379.
- Blakemore, R. P., Frankel, R. B., & Kalmijn, A. J. (1980). South-seeking magnetotactic bacteria in the Southern Hemisphere. *Physics*, 159.
- Faivre, D., & Schuler, D. (2008). Magnetotactic bacteria and magnetosomes. *Chemical Reviews*, 108(11), 4875-4898.
- Frankel, R. B., Bazyliński, D. A., Johnson, M. S., & Taylor, B. L. (1997). Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophysical journal*, 73(2), 994-1000.
- Frankel, R., Williams, T., & Bazyliński, D. (2007). Magneto-aerotaxis. Magnetoreception and magnetosomes in bacteria, 1-24.
- Gorby, Y. A., Beveridge, T. J., & Blakemore, R. P. (1988). Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *Journal of Bacteriology*, 170(2), 834-841.
- Grünberg, K., Müller, E. C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M., Reinhardt, R., & Schüler, D. (2004). Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 1040-1050.
- Komeili, A. (2011). Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 36(1), 232-255.
- Leão, P., Chen, Y. R., Abreu, F., Wang, M., Zhang, W. J., Zhou, K., Xiao, T., Wu, L.F. & Lins, U. (2017). Ultrastructure of ellipsoidal magnetotactic multicellular prokaryotes depicts their complex assemblage and cellular polarity in the context of magnetotaxis. *Environmental microbiology*.19(6), 2151-2163.
- Lefèvre, C. T., Bernadac, A., Yu-Zhang, K., Pradel, N. & Wu, L. F. (2009). Isolation and characterization of a magnetotactic bacterial culture from the Mediterranean Sea. *Environmental microbiology*, 11(7), 1646-1657.
- Lefèvre, C. T., & Dennis A. Bazyliński. (2013). Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), 497-526.
- Lefèvre, C. T., Bennet, M., Landau, L., Vach, P., Pignol, D., Bazyliński, D. A., Frankel, R. B., Klumpp, S., & Faivre, D. (2014). Diversity of magneto-aerotactic behaviors and oxygen sensing mechanisms in cultured magnetotactic bacteria. *Biophysical journal*, 107(2), 527-538.

- Lohße, A., Ullrich, S., Katzmann, E., Borg, S., Wanner, G., Richter, M., Voigt, B., Schweder, T., & Schüler, D. (2011). Functional analysis of the magnetosome island in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: the mamAB operon is sufficient for magnetite biomineralization. *PLoS One*, 6(10), e25561.
- Mann, S., Sparks, N. H., Frankel, R. B., Bazylinski, D. A., & Jannasch, H. W. (1990). Biomineralization of Ferrimagnetic Greigite (Fe (3) S (4)) and Iron Pyrite (FeS (2)) in a Magnetotactic Bacterium. *Nature*, 343(6255), 258.
- Morillo, V., Abreu, F., Araujo, A. C., de Almeida, L. G., Enrich-Prast, A., Farina, M., Vasconcelos, A. T. R., Bazylinski, D. A., & 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.
- 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 Ciências – Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 154 f.
- Murat, D., Quinlan, A., Vali, H., & Komeili, A. (2010). Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(12), 5593-5598.
- Richter, M., Kube, M., Bazylinski, D. A., Lombardot, T., Glöckner, F. O., Reinhardt, R., & 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(13), 4899-4910.
- Schüler, D. (2002). The biomineralization of magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *International microbiology*, 5(4), 209-214.
- Simmons, S. L., Bazylinski, D. A., & Edwards, K. J. (2006). South-seeking magnetotactic bacteria in the Northern Hemisphere. *Science*, 311(5759), 371-374.
- Simmons, S. L., Sievert, S. M., Frankel, R. B., Bazylinski, D. A., & Edwards, K. J. (2004). Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 6230-6239.
- Spormann, A. M., & Wolfe, R. S. (1984). Chemotactic, magnetotactic and tactile behaviour in a magnetic spirillum. *FEMS microbiology letters*, 22(3), 171-177.
- Zhang, W. Y., Zhou, K., Pan, H. M., Yue, H. D., Jiang, M., Xiao, T., & Wu, L. F. (2012a). Two genera of magnetococci with bean-like morphology from intertidal sediments of the Yellow Sea, China. *Applied and environmental microbiology*, 78(16), 5606-5611.
- Zhang, W.-J.; Santini, C.-L.; Bernadac, A.; Ruan, J.; Zhang, S.-D.; Kato, T.; Namba, K. & Wu, L.-F. (2012b). Complex spatial organization and flagellin composition of flagellar propeller from marine magnetotactic ovoid strain MO-1. *J. Mol. Biol.*, 416: 558-570.