

PEDRO DE ABREU CÔRTEZ BARROS

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS MAGNETOTÁTICAS EM RIACHOS
DO PARQUE NACIONAL DA TIJUCA, RIO DE JANEIRO



Monografia apresentada 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

2024

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Fernanda de Avila Abreu e coorientação de Anderson de Souza Cabral.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

d375d de Abreu Côrtes Barros, Pedro
DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS
MAGNETOTÁTICAS EM RIACHOS DO PARQUE NACIONAL DA
TIJUCA, RIO DE JANEIRO / Pedro de Abreu Côrtes
Barros. -- Rio de Janeiro, 2024.
69 f.

Orientadora: Fernanda de Ávila Abreu.
Coorientador: Anderson de Souza Cabral.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. diversidade. 2. bactérias magnetotáticas. 3.
bioprospecção. 4. magnetotaxia. 5. cultivo. I. de
Ávila Abreu, Fernanda, orient. II. de Souza Cabral,
Anderson, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

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(A): **PEDRO DE ABREU CÔRTEZ BARROS** DRE: 116018313

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Mateus Godoy (Presidente)
 Prof. Caio Rachid
 Prof. Jackeline Rosseti
 Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: **“Diversidade Morfológica de Bactérias Magnetotáticas em Riachos do Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro”**

Local: **Sala de reunião do Depart. Microbiologia Geral, IMPG/UFRJ**

Data e hora de início: **04 de julho de 2024 às 13:00h**

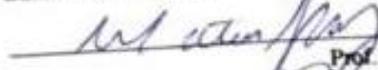
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 04 de julho de 2024.

NOTA:

8,58,58,5

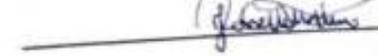
Banca Examinadora:



Prof. Mateus Godoy (Presidente)



Prof. Caio Rachid



Prof. Jackeline Rosseti



Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)



Pedro de Abreu Côrtes Barros

Aluno(a):

Orientador(a)
(e coorientador):

Profa. Fernanda de Ávila Abreu

Coordenadora de
TCC:

Profa. Marinkella Silva Laport

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Fernanda Abreu por me receber, orientar e permitir que este projeto fosse realizado, ao Dr. Anderson Cabral pelos vários ensinamentos, coorientação e por fazer com que o projeto acontecesse e à equipe do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia – LaBMax.

À Unidade de Microscopia Multiusuário Padrón-Lins – Unimicro – e o tecnólogo Dr. Jefferson Cypriano pelos ensinamentos e auxílio no uso dos equipamentos e obtenção das imagens deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Hidrobiologia da UFRJ e da Unidade de Citometria Aplicada à Ecologia Aquática e à Oceanografia – UCEA – pelas análises de nutrientes de amostras de água e contagem de procariotos totais por citometria de fluxo.

À Katyucha von Kossel e equipe do Parque Nacional da Tijuca (PNT) e ICMBio pela autorização e apoio às coletas no Rio das Almas e Rio Trapicheiros.

À Ma. Carol Valladares do Laboratório de Ecologia de Peixes pela troca de informações e dicas sobre coletas no PNT.

À minha família, em especial minha mãe, Rosani Abreu, que ajudou diretamente no contato com equipes responsáveis por possíveis locais de coleta, inclusive do PNT.

À minha amiga Mariana Freitas de Andrade que sugeriu e participou de coletas e análises em laboratório que foram importantes para o andamento do projeto, além de auxiliar na busca de dados geográficos para montagem dos mapas apresentados neste trabalho.

Aos professores, técnicos e discentes da UFRJ envolvidos nos projetos artísticos que ajudei a produzir que, além de permitirem que tudo acontecesse, tornaram-se grandes amigas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

PEDRO DE ABREU CÔRTEZ BARROS

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS MAGNETOTÁTICAS EM
RIACHOS DO PARQUE NACIONAL DA TIJUCA, RIO DE JANEIRO**

Orientadora: Fernanda de Avila Abreu

Coorientador: Anderson de Souza Cabral

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O Parque Nacional da Tijuca (PNT) é um ambiente rico em biodiversidade, abrigando uma variedade de espécies de plantas, animais e microrganismos. Possui uma variedade de ecossistemas, incluindo rios e riachos de água doce. Esses riachos são habitats para bactérias magnetotáticas (BMs), cuja diversidade ainda não foi explorada nesse ambiente. Foram realizadas amostragens de água e sedimento em dois riachos do PNT: Rio das Almas e Rio Trapicheiros. As amostras foram analisadas por métodos químicos e físicos a fim de se realizar uma caracterização dos fatores abióticos no ambiente, e por meio de técnicas de microscopia óptica e eletrônica para a caracterização das BMs presentes. Foi medida uma constância nos valores de parâmetros abióticos em cada rio e entre eles. Também, foi possível observar uma grande quantidade e diversidade de BMs, além de se constatar que a comunidade desses organismos se modifica com o tempo. Uma estirpe de maior prevalência foi caracterizada morfológica e ultraestruturalmente com métodos independentes de cultivo, mostrando a qualidade de seus cristais. Ao tentar cultivar as BMs encontradas, foram observados espirilos provavelmente magnetotáticos em um dos meios de cultura, mas não foi possível os repicar. Em outras tentativas, apenas organismos não magnetotáticos foram encontrados. Assim, se faz necessária a continuação do estudo para estabelecer um melhor conhecimento sobre a variação nas populações de BMs e para realizar novas tentativas de cultivo. Com isso, espera-se que este estudo sirva como base para a bioprospecção de BMs no PNT e outros rios e riachos da Mata Atlântica, a fim de explorar o grande potencial biotecnológico que as BMs oferecem.

Palavras-chave: diversidade, magnetotaxia, bioprospecção, bactérias magnetotáticas, cultivo

ABSTRACT**PEDRO DE ABREU CÔRTEZ BARROS****DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS MAGNETOTÁTICAS EM
RIACHOS DO PARQUE NACIONAL DA TIJUCA, RIO DE JANEIRO****Orientadora: Fernanda de Avila Abreu****Coorientador: Anderson de Souza Cabral**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The Tijuca National Park (PNT) is a biodiversity-rich environment, home to a variety of plant, animal, and microorganism species. It contains a variety of ecosystems, including freshwater rivers and streams. These streams are habitats for magnetotactic bacteria (MTB), whose diversity has not yet been explored in this environment. Water and sediment samples were collected from two streams in the PNT: Rio das Almas and Rio Trapicheiros. The samples were analyzed using chemical and physical methods to characterize the abiotic factors in the environment, and optical and electron microscopy techniques to characterize the MTB present. A consistency in the values of abiotic parameters was measured in each river and between them. A large quantity and diversity of MTB were also observed, and it was found that the community of these organisms changes over time. A strain of higher prevalence was characterized morphologically and ultrastructurally using culture-independent methods, showing the quality of its crystals. When attempting to cultivate the MTB found, spirilla, likely magnetotactic, were observed in one of the culture media, but they could not be replicated. In other attempts, only non-magnetotactic organisms were found. Thus, continued study is necessary to gain a better understanding of the variations in MTB populations and to make new cultivation attempts. It is hoped that this study will serve as a basis for the bioprospecting of MTB in the PNT and other rivers and streams in the Atlantic Forest, in order to explore the great biotechnological potential that MTB offer.

Keywords: diversity, magnetotaxis, bioprospection, magnetotactic bacteria, culture

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS**PEDRO DE ABREU CÔRTEZ BARROS****DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS MAGNETOTÁTICAS EM RIACHOS DO PARQUE NACIONAL DA TIJUCA, RIO DE JANEIRO****Orientadora: Fernanda de Avila Abreu****Coorientador: Anderson de Souza Cabral**

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Bactérias Magnetotáticas (BMs) são bactérias capazes de produzir cristais magnéticos, que podem ser extraídos e utilizados em diversas aplicações biotecnológicas em várias áreas, como medicina, agricultura, indústria etc. As BMs são organismos cujo cultivo em laboratório é difícil, já que são exigentes em relação às condições físicas e químicas necessárias para seu crescimento e multiplicação. Por seu grande potencial biotecnológico, a busca por novas BMs que possam ser facilmente cultivadas em laboratório e produzam uma grande quantidade de cristais de forma mais eficiente é um passo importante para avançar os estudos nessa área. Por isso, este estudo analisou a diversidade de BMs em riachos no Parque Nacional da Tijuca (PNT), uma unidade de conservação da Mata Atlântica no Rio de Janeiro. Lá, foram encontradas, além de um grande número de BMs, diversas espécies dessas bactérias, o que torna o PNT um bom local para a busca de espécies que tenham as características ideais para seu cultivo em laboratório e uso na biotecnologia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – **A.** Representação dos *clusters* do magnetossomo da cepa AMB-1. **B.** Esquema da formação de magnetossomos a partir da membrana interna (MI) em uma BM. Primeiro ocorre a invaginação da MI formando membranas do magnetossomo vazias (EMMs) e, em seguida, a nucleação e crescimento do cristal a partir do processo de biomineralização, formando membranas do magnetossomo com cristal (CMMs). Figura adaptada de Wan *et al.* (2022). .. 1
- Figura 2** – Representação da interação entre um dipolo magnético e um campo magnético. O símbolo \otimes representa um vetor com sentido entrando na imagem. Figura retirada de Young & Freedman (2016). 2
- Figura 3** – Esquema mostrando as linhas de campo magnético em volta do planeta Terra, evidenciando as linhas geográficas e diferentes nortes. Figura retirada de Marques (2009). ... 3
- Figura 4** – Esquema mostrando o movimento flagelar e o conseqüente deslocamento das BMs de acordo com o campo geomagnético nos diferentes hemisférios do planeta. Figura retirada de Morillo (2014). 4
- Figura 5** – Representação do magnetossomo com possíveis funcionalizações e aplicações descritas na literatura (separação celular, hipertermia, transporte de fármaco, geração de contraste de imagem, análise de alimentos, imobilização enzimática e biorremediação, recuperação/detecção de antígeno/DNA). Figura adaptada de Vargas *et al.* (2018), retirada de Cypriano (2019). 6
- Figura 6** – Árvore filogenética de BMs cultivadas e não cultivadas baseada em diversos genes marcadores filogenéticos. Observa-se os diferentes representantes nas classes *Alpha-*, *Gamma* e *Delta-* do filo *Proteobacteria*, no filo *Nitrospirae*, no filo *Omnitrophica* e referentes aos filios *Planctomycetes*, *Latescibacteria*, *Zetaproteobacteria* e *Ca. Lambdaproteobacteria* têm-se resultados de análises metagenômicas que encontraram genes de biomineralização. Em vermelho encontram-se as sequências obtidas por métodos independentes de cultivo em Lin *et al.* (2018), e em preto, cepas já cultivadas. Figura retirada de Taveira (2020). 8
- Figura 7** – Mapa do PNT mostrando os rios e riachos presentes na floresta, destacada em verde. Imagem retirada do site do Parque Nacional da Tijuca (2020). 15
- Figura 8** – Mapa da cidade do Rio de Janeiro com o Rio das Almas, à esquerda, e Rio Trapicheiros, à direita, destacados em vermelho. 16
- Figura 9** – **A.** Rio das Almas com os pontos de amostragem em vermelho. O sentido da corrente do rio é de P1 a P3. O ponto P1 está localizado um pouco antes da Cachoeira das Almas, enquanto o P2 se localiza após a cachoeira. **B.** Foto tirada no Rio das Almas. 17
- Figura 10** – **A.** Rio Trapicheiros com os pontos de amostragem em vermelho. O sentido da corrente do rio é de P4 a P6. O ponto P6 corresponde à barragem presente no rio. Banhistas foram observados em P5 e P6. **B.** Foto tirada no Rio Trapicheiros, no P6. 18
- Figura 11** – Recipiente de amostragem de amostra com indicação do assoalho do rio e um ímã posicionado na lateral do pote, onde se observa a concentração de BMs. 19
- Figura 12** – Esquema de montagem da lâmina de microscopia para o uso da técnica da gota pendente. 20

- Figura 13** – Grade de cobre próxima a um ímã contendo uma gota com BMs enriquecidas magneticamente. 21
- Figura 14** – Diversidade morfológica de magnetossomos. **A.** Magnetossomos cuboetaédricos alinhados em cadeia em espirilo não cultivado de amostras coletadas no rio Ubatiba (Maricá – RJ). Ilustração inserida: morfologia cristalina cuboetaédrica. **B.** Magnetossomos octaédricos alinhados em cadeia em vibrião não cultivado encontrado em amostras coletadas no Saco do Mamanguá (Paraty Mirim – RJ). Ilustração inserida: morfologia cristalina octaédrica. **C.** Magnetossomos com morfologia prismática alongada ou pseudo-hexagonal organizados em cadeia em um vibrião não cultivado encontrado em amostras coletadas no Saco do Mamanguá (Paraty Mirim – RJ). Ilustração inserida: morfologia cristalina prismática. **D.** Seção de um corte ultrafino de um bastonete não cultivado encontrado em amostras provenientes do rio Ururá (Campos dos Goytacazes – RJ) contendo magnetossomos com morfologia anisotrópica. Ilustração inserida: morfologia cristalina anisotrópica. Todas as imagens foram obtidas do acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia do IMPG, UFRJ. Figura retirada de Taveira (2020). 22
- Figura 15** – Aparato de RT posicionado ao lado de um ímã. Estão representadas as BMs (pontos pretos) e bactérias não-magnetotáticas (pontos vermelhos) na água (em azul). 23
- Figura 16** – Tubo contendo o meio de cultura e o inóculo inicial de BMs. Com o passar do tempo, as BMs formam uma faixa de crescimento próxima à IOA. 24
- Figura 17** – Precipitação medida nas estações meteorológicas mais próximas aos locais de amostragem. **A.** Chuvas em dezembro de 2021 até a coleta no dia 11. **B.** Chuvas em dezembro de 2022. A coleta foi realizada antes do dia 20, porém, não foi possível obter uma data exata. **C.** Chuvas em fevereiro de 2023 até a coleta no dia 13. **D.** Chuvas em maio de 2023 até a coleta no dia 15. 27
- Figura 18** – BMs encontradas nas amostras do ponto P1. **A e B.** Microscopia óptica por DIC da gota pendente feita a partir do recipiente de coleta. **C.** MET de um grupo de BMs. É possível ver os grânulos e magnetossomos. **D.** Detalhe, por MET, da cadeia de magnetossomos de morfologia cuboetaédrica de uma das BMs. 31
- Figura 19** – **A.** Comprimento x Largura dos magnetossomos. A regressão linear com valores de $a = 0,942 \pm 0,003$ e $R^2 = 0,98$ indica uma alta simetria dos cristais. **B.** *Boxplot* dos fatores de forma, indicando uma distribuição não normal da simetria dos cristais, possuindo a maioria uma alta simetria. 32
- Figura 20** – Histograma dos comprimentos dos magnetossomos. Observa-se um pico nos maiores tamanhos, próximo à média, e uma cauda nos menores. 33
- Figura 21** – Gráfico de dispersão do Fator de Forma x Comprimento. Observa-se uma aglomeração no quadrante superior direito. Porém, testes estatísticos revelam que a correlação entre as duas variáveis não é significativa ($r_s = 0,04$ e $p = 9,86\%$). 34
- Figura 22** – Observação do comportamento magnetotático das BMs coletadas no P6 durante o primeiro semestre de 2022 por microscopia óptica por DIC. As células se movimentam de forma antiparalela ao campo magnético gerado pelo ímã, se concentrando na borda da gota. A barra vermelha representa o pólo norte do ímã, enquanto a barra azul representa o polo sul. **A.** Grande diversidade de BMs no dia da amostragem. **B.** Perfil da diversidade de BMs após 7 meses da coleta, indicando resiliência de alguns grupos. 35

- Figura 23** – Diferentes morfologias de BMs e de magnetossomos encontradas na realização de MET a partir da amostra ambiental do P6 no primeiro semestre de 2022. Foram observados cocos (A, B, C, F), espirilos (E), vibriões, (D) e bastonetes (G, H) com diferentes morfologias, números e arranjos de magnetossomos. 36
- Figura 24** – Células magnetotáticas na amostra coletada no P6 em dezembro de 2022. Vê-se uma grande diversidade morfológica de BMs, como bacilos (B), cocos (C), vibriões (V) e o morfotipo com grânulos relativamente grandes (G) 37
- Figura 25** – MET das diferentes BMs encontradas na amostra coletada no P6 durante o segundo semestre de 2022. Foram observados cocos (A, F), bacilos (B, C, D, E) e outras morfologias não mostradas na imagem, como espirilos e vibriões. É possível ver diferentes arranjos de magnetossomos, como dois pares de cadeias em (A), uma cadeia em (F), além de diferentes morfologias, observando os cristais em (A) – cuboctaédricos –, (E) – anisotrópicos – e (F) – octaédricos. 38
- Figura 26** – Microscopia óptica por DIC da gota pendente feita a partir da amostra ambiental do P4, no Rio Trapicheiros, de fevereiro de 2023. 38
- Figura 27** – Células não magnetotáticas nos meios de cultura heterotróficos com inóculo de BMs do P6 do primeiro semestre de 2022. **A.** Células com prolongamentos e bacilos. **B.** Bacilos. **C.** Cocobacilos. **D.** Células com formato cocoide. 39
- Figura 28** – MET de amostras das faixas de crescimento a partir do meio de cultura onde foram observados espirilos possivelmente magnetotáticos. **A.** Espirilos contendo cristais possivelmente magnéticos. **B.** Detalhe dos magnetossomos dos espirilos em (A). 40
- Figura 29** – MET dos bacilos sem cristais no meio utilizado para repique dos espirilos. 41
- Figura 30** – Diagrama de fase magnética para magnetita biogênica de magnetossomos. Os diagramas à direita representam esquematicamente o arranjo dos momentos magnéticos de partículas com dois domínios, um domínio ou superparamagnéticas. Regiões cinzas representam o comprimento e fator de forma de magnetossomos de BMs. Figura adaptada de Kopp e Kirschvink (2008). 44

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Exemplos de cepas já cultivadas de BMs.	9
Quadro 2 – Pontos de amostragem e análises realizadas em cada data de coleta.	16
Tabela 1 – Coordenadas e altitude dos pontos de amostragem no Rio das Almas.	17
Tabela 2 – Coordenadas e altitude dos pontos de amostragem no Rio Trapicheiros.	18
Tabela 3 – Média dos valores dos parâmetros físico-químicos medidos em cada coleta.	28
Tabela 4 – Abundância de Procariotos nos diferentes pontos de amostragem no verão (fev./2023) e outono (mai./2023).	29
Quadro 3 – Quantidade relativa de BMs encontradas nos pontos de amostragem em cada data de coleta.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT – Abundância de Procariotos Totais

BMs – Bactérias Magnetotáticas

CMMs – *Crystal-containing Magnetosome Membranes* (Membranas do Magnetossomo com Cristal)

DIC – *Differential Interference Contrast* (Contraste Diferencial Interferencial)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EMMs – *Empty Magnetosome Membranes* (Membranas do Magnetossomo Vazias)

IOA – Interface Óxica-Anóxica

ME – Membrana Externa

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MI – Membrana Interna

N – Nitrogênio

NS – *North-Seeking* (tipo Norte)

OD – Oxigênio Dissolvido

P – Fósforo

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PNT – Parque Nacional da Tijuca

RNAr – *Ribosomal Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico Ribossomal)

RT – *Racetrack*

SS – *South-Seeking* (tipo Sul)

UC – Unidade de Conservação

WGA – *Whole Genome Amplification* (Amplificação do Genoma Completo)

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
FOLHA DE APROVAÇÃO	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xii
ÍNDICE	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Bactérias magnetotáticas	1
1.2 Magnetotaxia	2
1.2.1 Campo geomagnético	2
1.2.2 Interação de BMs com o campo magnético	3
1.2 Potencial biotecnológico das BMs	5
1.3 Papel ecológico de BMs	7
1.3.1 Ciclos biogeoquímicos	7
1.4 Diversidade e cultivo de BMs	8
1.5 Mata Atlântica e o Parque Nacional da Tijuca	11
1.6 BMs no PNT	13
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Área de estudo	16
4.1.1 Rio das Almas	18
4.1.2 Rio Trapicheiros	20
4.2 Amostragem e transporte	21
4.3 Concentração Magnética de BMs	21
4.4 Caracterização morfológica	22
4.4.1 Microscopia óptica	22
4.4.1.1 Gota pendente	22
4.4.2 Caracterização da ultraestrutura	23
4.4.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	23

4.4.2.2 Caracterização e quantidade de magnetossomos e grânulos	23
4.3.2 Racetrack (RT)	24
4.3.2.1 Construção do aparato de RT	24
4.3.2.2 Concentração das BMs	25
4.6 Cultivo de BMs	25
4.7 Citometria de fluxo	26
4.8 Análise de nutrientes	27
4.9 Estatística	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Caracterização do ambiente	28
5.1.1 Análise pluviométrica	28
5.1.2 Análise físico-química dos rios	29
5.1.3 Contagem de procariotos totais	30
5.3 Diversidade morfológica de BMs	31
5.3.1 Rio das Almas	31
5.3.2 Rio Trapicheiros	36
5.4 Cultivo	40
6 DISCUSSÃO	42
6.1 O ambiente e seus fatores abióticos	42
6.1.1 Clima e chuvas	42
6.1.2 Fatores físico-químicos na água	43
6.3 Caracterização dos magnetossomos e grânulos	43
6.2 Diversidade de BMs	45
6.2.1 Rio das Almas	45
6.2.2 Rio Trapicheiros	45
6.4 Crescimento em meio de cultura	46
7 CONCLUSÕES	48
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9 APÊNDICES	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bactérias magnetotáticas

Bactérias magnetotáticas (BMs) são procariotos morfológica, metabólica e filogeneticamente diversos, microaerófilos ou anaeróbios, Gram-negativos, capazes de realizar a biomineralização de ferro disponível no ambiente para a formação de cristais de magnetita (Fe_3O_4) ou greigita (Fe_3S_4). Esses cristais são envoltos por uma bicamada lipídica advinda da membrana interna, dando origem a organelas denominadas de magnetossomos (Blakemore, 1975) (Figura 1B). Essa biomineralização é regulada por diversos genes, dispostos em *clusters* genômicos – os *clusters* do magnetossomo (Figura 1A) –, sendo a maioria transcrita como operons, que atuam controlando desde a invaginação da membrana interna, a nucleação e o crescimento dos cristais até sua disposição no interior da bactéria (Abreu *et al.*, 2020; Murat *et al.*, 2010). Essa regulação genética da mineralização em BMs confere alta qualidade dos cristais, o que diferencia o processo da mineralização abiótica de magnetita e greigita (Morillo, 2014).

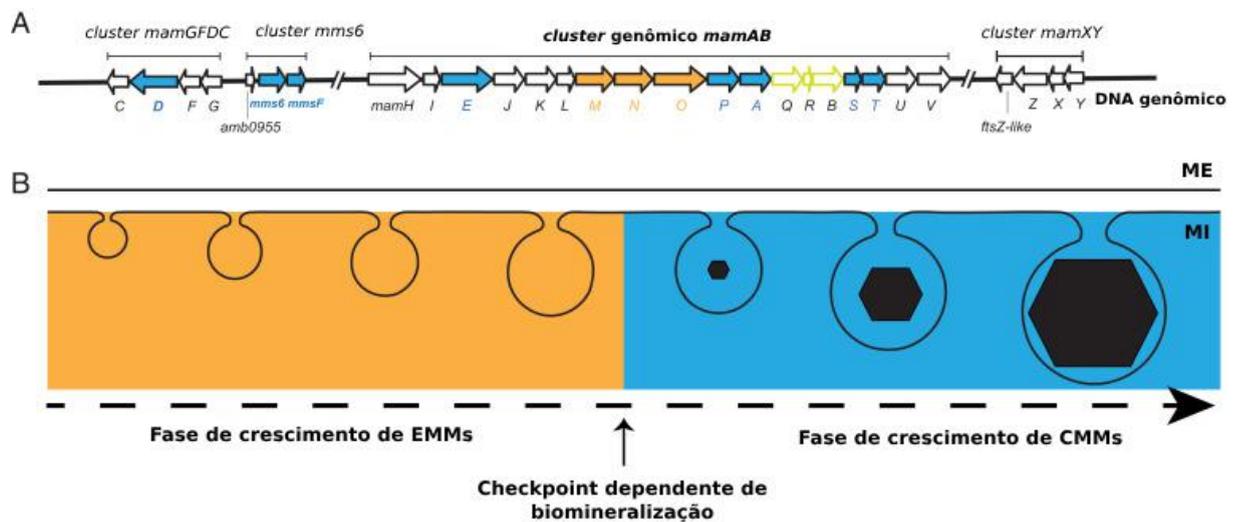


Figura 1 – **A.** Representação dos *clusters* do magnetossomo da cepa AMB-1. **B.** Esquema da formação de magnetossomos a partir da membrana interna (MI) em uma BM. Primeiro ocorre a invaginação da MI formando membranas do magnetossomo vazias (EMMs) e, em seguida, a nucleação e crescimento do cristal a partir do processo de biomineralização, formando membranas do magnetossomo com cristal (CMMs). Figura adaptada de Wan *et al.* (2022).

1.2 Magnetotaxia

1.2.1 Campo geomagnético

Quando um material possui seus elétrons alinhados com uma direção e sentido, é gerado um momento de dipolo magnético, dando origem a dois pólos, norte e sul, fazendo com que o objeto se comporte como um ímã, possibilitando a interação com outros campos (Blundell, 2001). A interação entre um dipolo magnético e um campo magnético pode gerar uma força de rotação ou torque no material em função do ângulo da interação (Chikazumi, 1997). Esse torque ($\vec{\tau}$) pode ser calculado por um produto vetorial entre o momento de dipolo magnético ($\vec{\mu}$) e o campo magnético (\vec{B}), de acordo com a equação:

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{B}$$

O torque aplicado ao material resulta em sua rotação e consequente alinhamento às linhas de campo (Cullity e Graham, 2011) (Figura 2).

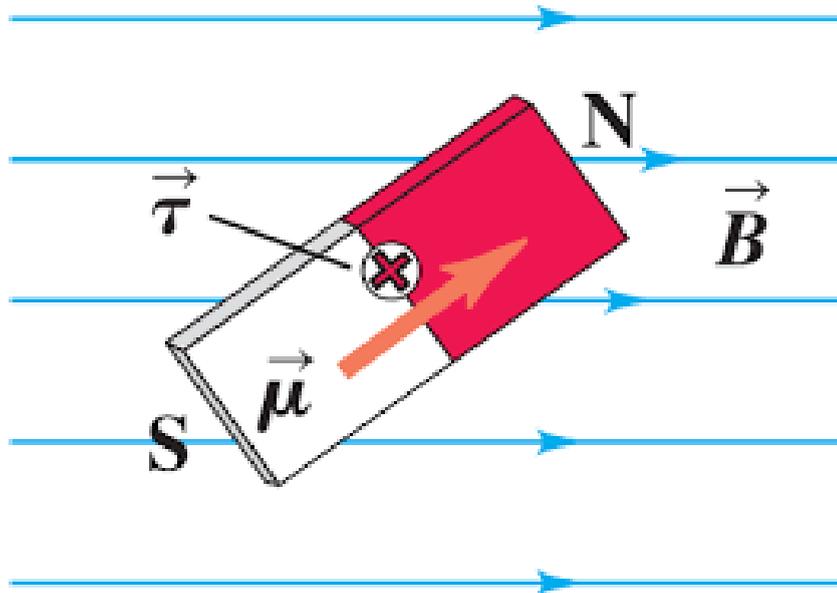


Figura 2 – Representação da interação entre um dipolo magnético e um campo magnético. O símbolo \otimes representa um vetor com sentido entrando na imagem. Figura retirada de Young & Freedman (2016).

O planeta Terra é fonte de um campo magnético que o envolve, protegendo sua superfície dos danos causados pela interação com radiações cósmicas e solares (Merrill, McElhinny e McFadden, 1996). O campo geomagnético, como é chamado, tem seu polo norte próximo ao sul geográfico da Terra, enquanto seu polo sul está perto do polo norte geográfico (Langel, 1987) (Figura 3).

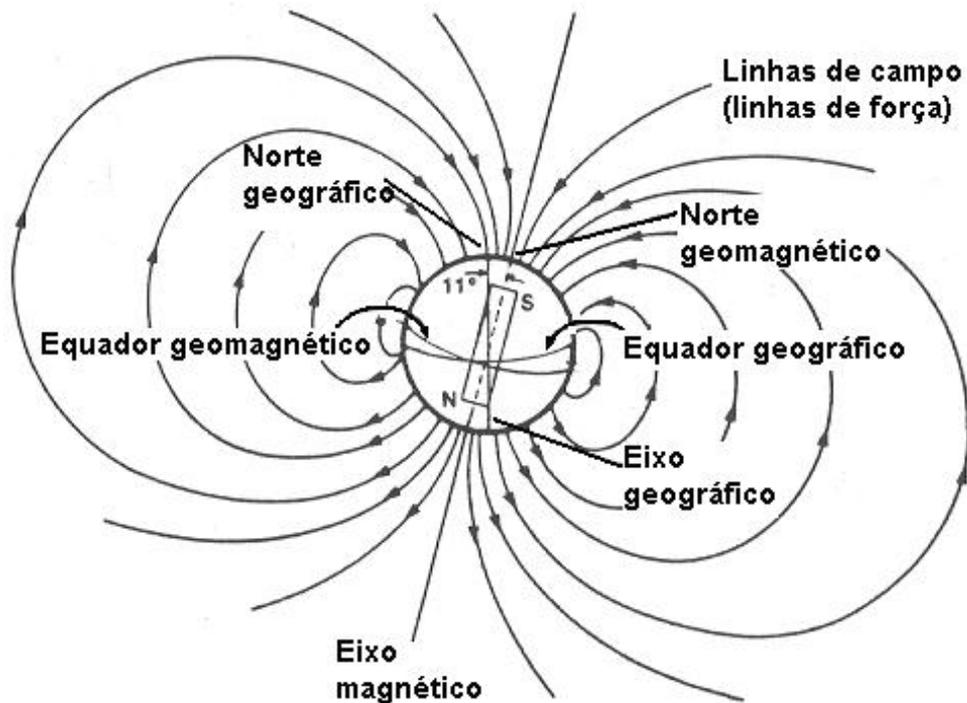


Figura 3 – Esquema mostrando as linhas de campo magnético em volta do planeta Terra, evidenciando as linhas geográficas e diferentes nortes. Figura retirada de Marques (2009).

1.2.2 Interação de BMs com o campo magnético

A biomineralização dos cristais de magnetita ou greigita torna possível a interação das BMs com o campo magnético, já que são os magnetossomos, quando alinhados em cadeia no citoplasma, os responsáveis pela produção de um momento de dipolo magnético permanente na célula. Um torque é gerado nas BMs de acordo com o ângulo de seu vetor momento em relação às linhas de campo magnético, rotacionando as BMs até que suas cadeias de magnetossomos fiquem alinhadas ao campo. Esse posicionamento, em conjunto com o movimento flagelar, permite o direcionamento das bactérias de acordo com o campo magnético, característica que ficou conhecida como magnetotaxia (Blakemore, 1975). As BMs são microaerófilas ou anaeróbias, e a magnetotaxia, permite o posicionamento das BMs

na interface óxica-anóxica (IOA) dentro da coluna d'água, buscando a concentração de oxigênio ideal para sua sobrevivência (Figura 4). Como esse direcionamento envolve um gradiente de oxigênio, o movimento também é chamado de magneto-aerotaxia (Frankel *et al.*, 1997). O conceito pode, ainda, ser expandido para a redoxtaxia, que é o movimento que envolve a busca por ambientes com concentrações ideais de compostos redutores e oxidantes, permitindo o uso eficiente deles como doadores e aceptores de elétrons durante a síntese de ATP nas células (Bazylinski & Frankel, 2004; Abreu *et al.*, 2020)

Nos dois hemisférios do planeta, o campo geomagnético possui sentidos opostos. Com isso, existem dois tipos de comportamento magnetotático: comportamento *north-seeking* (tipo Norte; NS) e *south-seeking* (tipo Sul; SS) (Spring *et al.*, 1998). As bactérias NS têm preferência pelo movimento no mesmo sentido das linhas de campo magnético – movimento paralelo ao campo –, sendo direcionadas para o polo norte geográfico, que se aproxima do sul magnético, enquanto as SS nadam preferencialmente no sentido oposto – antiparalelamente ao campo –, sendo direcionadas para o sul geográfico, que se aproxima do norte magnético (Blakemore, 1982) (Figura 4). Dessa forma, é possível encontrar uma maior quantidade de bactérias NS ou SS dependendo do hemisfério onde a análise está sendo realizada. No hemisfério sul, a maioria das BMs possui o comportamento SS, enquanto no norte do planeta, as BMs mais encontradas são as NS.

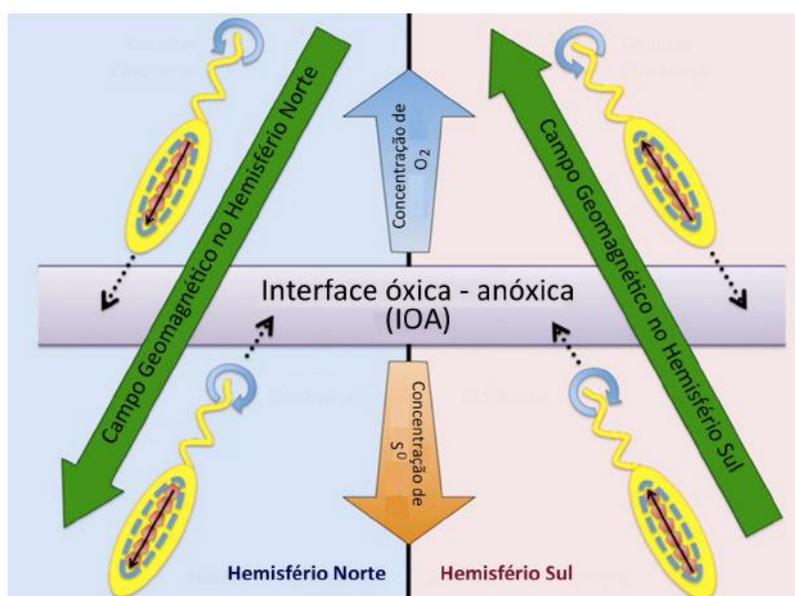


Figura 4 – Esquema mostrando o movimento flagelar e o consequente deslocamento das BMs de acordo com o campo geomagnético nos diferentes hemisférios do planeta. Figura retirada de Morillo (2014).

1.2 Potencial biotecnológico das BMs

Como a mineralização dos cristais de magnetita ou greigita é controlada geneticamente, cada espécie de BM produz essas estruturas com características específicas, como o tamanho e formato. Além disso, os cristais biomineralizados por BMs possuem alto grau de pureza e a quantidade de defeitos é baixa (Mann *et al.*, 1984), o que favorece o seu uso biotecnológico e ainda não foi reproduzido para partículas sintéticas (Vargas *et al.*, 2018; Cypriano, 2019). Os magnetossomos podem ser extraídos das BMs sem a perda de sua membrana, caracterizando o produto como nanopartículas naturalmente revestidas.

A produção natural dessas partículas possui um menor custo se comparada ao processo laboratorial de síntese de nanopartículas revestidas. Além disso, esse revestimento natural, por advir da membrana citoplasmática das BMs, possui proteínas que podem ser utilizadas em reações de funcionalização dos magnetossomos com outros compostos de interesse, como antibióticos, agentes de contraste e moléculas terapêuticas, tomando vantagem de sua capacidade de responder ao campo magnético (Vargas *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2023). Porém, os magnetossomos podem ser utilizados diretamente após sua extração e purificação, sem a necessidade de uma funcionalização, já que podem ser tratados como nanopartículas magnéticas e usados em aplicações onde apenas sua resposta ao campo magnético é necessária (Vargas *et al.*, 2018).

O avanço dos estudos dos magnetossomos possibilitou o desenvolvimento de ferramentas nanobiotecnológicas promissoras, nos campos da medicina, como sistemas de entrega de medicamentos e agentes de hipertermia para tratamento de câncer, na agricultura, como nanocarregadores de pesticidas, na ecologia, para monitoramento ambiental, em análises laboratoriais, como separadores magnéticos, e em processos industriais, como biocatálise magnética (Vargas *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2023) (Figura 5). Além disso, as próprias BMs mostram potencial de utilização por seu metabolismo, já que algumas podem produzir metabólitos secundários de interesse biotecnológico, como sideróforos, antibióticos e pigmentos (Araújo *et al.*, 2015). Dada a diversidade das BMs e de seus magnetossomos, é natural imaginar que o estudo do potencial biotecnológico dos cristais biomineralizados por esses organismos ainda pode ser ampliado, além de permitir o maior entendimento sobre outras funções dessas organelas.

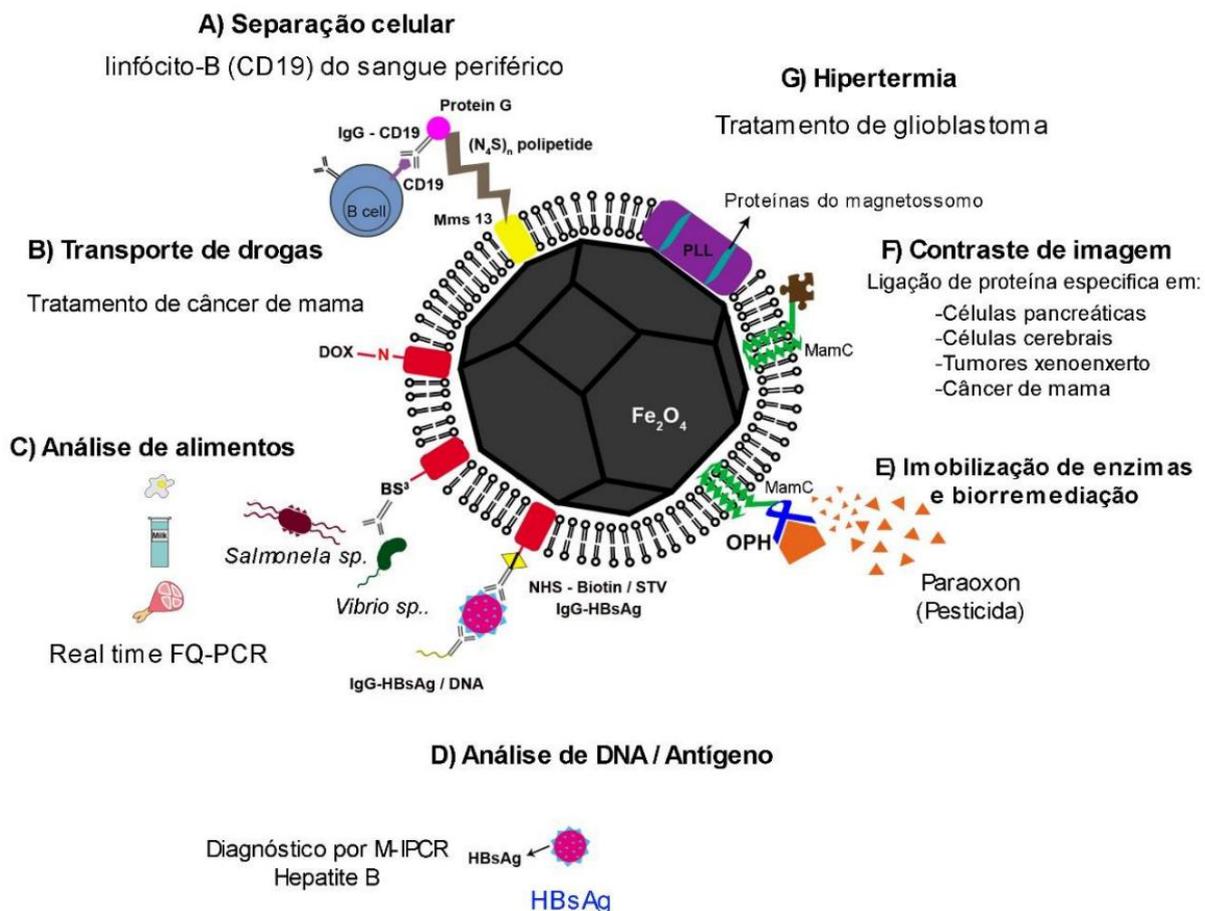


Figura 5 – Representação do magnetossomo com possíveis funcionalizações e aplicações descritas na literatura (separação celular, hipertermia, transporte de fármaco, geração de contraste de imagem, análise de alimentos, imobilização enzimática e biorremediação, recuperação/detecção de antígeno/DNA). Figura adaptada de Vargas *et al.* (2018), retirada de Cypriano (2019).

Já está claro que o custo de produção de magnetossomos biológicos é menor que seus análogos sintéticos (Xie *et al.*, 2009; Correa *et al.*, 2021), entretanto, a busca por espécies de BMs que tenham um maior rendimento de produção dessas organelas ou que sejam menos exigentes quanto as necessidades para seu cultivo poderá possibilitar maior democratização do uso das tecnologias a elas relacionadas. Dessa forma, torna-se necessária, além da busca por novas espécies, a adequação de seu cultivo, visando facilitar sua utilização em larga escala.

1.3 Papel ecológico de BMs

Além de sua importância na exploração de ferramentas biotecnológicas, as próprias BMs são componentes vitais dos ecossistemas aquáticos, com papéis importantes nos ciclos biogeoquímicos do ferro, enxofre e nitrogênio, além de contribuírem para a degradação de matéria orgânica. Ainda, a presença e atividade das BMs influenciam significativamente a estrutura e a função dos ecossistemas aquáticos. Elas contribuem para a formação de nichos microbianos específicos e afetam a composição microbiana geral (Lefèvre et al., 2013).

1.3.1 Ciclos biogeoquímicos

As BMs desempenham um papel crucial nos ciclos biogeoquímicos do ferro e do enxofre. Ao biomineralizar magnetita (Fe_3O_4) ou greigita (Fe_3S_4), elas influenciam diretamente a mobilidade e a biodisponibilidade desses minerais (Frankel *et al.*, 1997). A biomineralização de magnetita por BMs facilita a redução de ferro na coluna d'água, afetando a ciclagem do ferro e a disponibilidade de ferro para outros organismos aquáticos (Faivre e Schüller, 2008).

Algumas BMs também têm impacto no ciclo do nitrogênio. Elas podem participar na desnitrificação, um processo que converte nitrato (NO_3^-) em nitrogênio gasoso (N_2), ajudando na remoção de nitrogênio dos sistemas aquáticos e, assim, contribuindo para a mitigação da eutrofização (Bazylinski *et al.*, 1995). Esta atividade desnitrificante das BMs revela seu potencial como agentes biológicos importantes para o equilíbrio do nitrogênio em ambientes aquáticos.

Ainda, as BMs são capazes de utilizar diferentes fontes de carbono e energia, participando ativamente na ciclagem de carbono (Spring *et al.*, 1994).

1.4 Diversidade e cultivo de BMs

As BMs são bactérias ubíquas, podendo ser encontradas espécies em sedimentos rasos, mar profundo e colunas d'água em ambientes de água doce, salobros, marinhos, hipersalinos, podendo suportar pH alcalino ou neutro, além de temperaturas extremas (Moench *et al.*, 1978; Blakemore, 1982; Bazylinski *et al.*, 1995; Petermann *et al.*, 1993; Abreu *et al.*, 2007; Abreu, 2010; Lefèvre *et al.*, 2010). Estão distribuídas em vários grupos, contendo exemplos no filo *Proteobacteria* nas classes *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-*, *Zeta-*, *Ca. Eta-*, *Lambda-* e *Muproteobacteria*, além de serem encontradas nos clados *Nitrospirae*, *Ca. Omnitrophica*, *Planctomycetes* e *Ca. Latescibacteria* (Lin *et al.*, 2018), como demonstrado na figura 6.

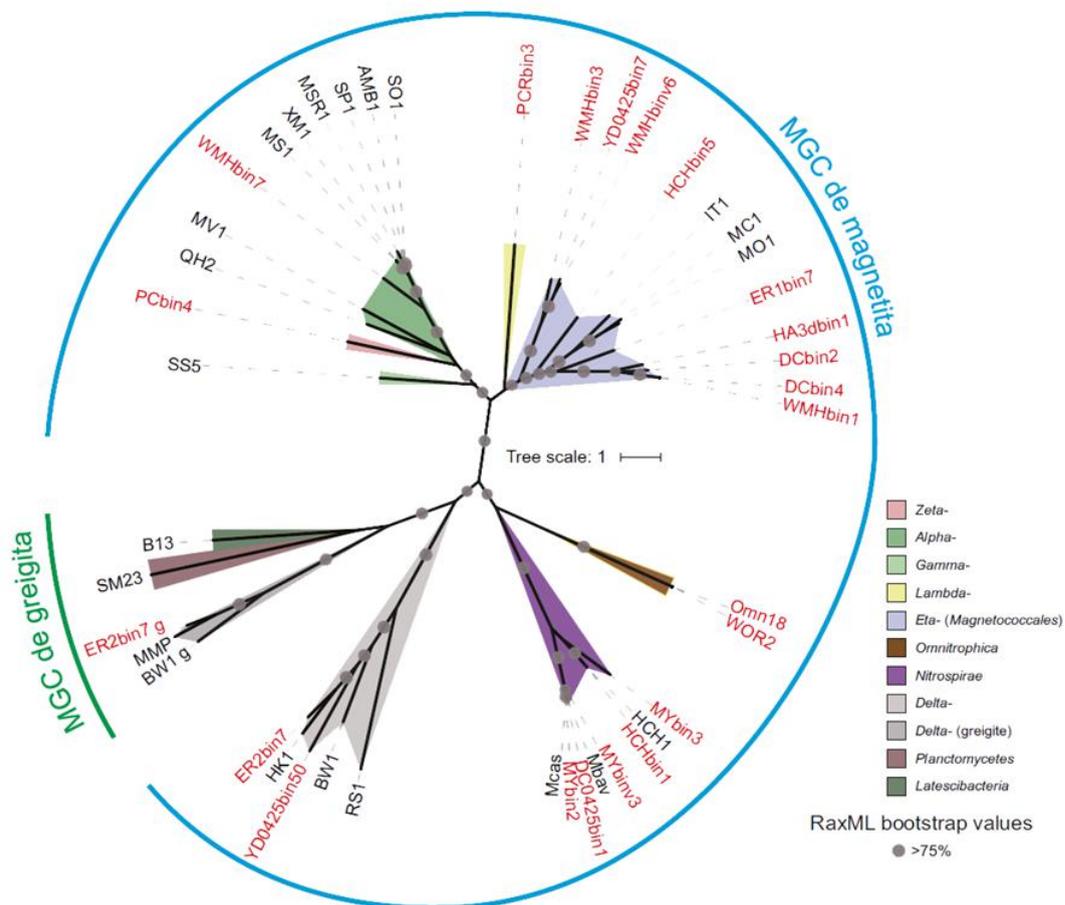


Figura 6 – Árvore filogenética de BMs cultivadas e não cultivadas baseada em diversos genes marcadores filogenéticos. Observa-se os diferentes representantes nas classes *Alpha-*, *Gamma* e *Delta-* do filo *Proteobacteria*, no filo *Nitrospirae*, no filo *Omnitrophica* e referentes aos filios *Planctomycetes*, *Latescibacteria*, *Zetaproteobacteria* e *Ca. Lambdaproteobacteria* têm-se resultados de análises metagenômicas que encontraram genes de biomineralização. Em vermelho encontram-se as sequências obtidas por métodos independentes de cultivo em Lin *et al.* (2018), e em preto, cepas já cultivadas. Figura retirada de Taveira (2020).

A diversidade de BMs nos ambientes pode ser influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos, o que contribui para as pressões seletivas que favoreceram o aparecimento de novas cepas e espécies ao longo do tempo. Alguns dos fatores que influenciam nessa biodiversidade são a salinidade, temperatura, concentrações de nitrato e compostos de enxofre, além dos gradientes de oxigênio e de oxirredução nas colunas d'água e sedimentos (Lin *et al.*, 2013).

Contudo, mesmo com sua grande diversidade e todos os avanços nas pesquisas, poucas são as BMs que foram cultivadas, todas pertencentes ao filo *Proteobacteria* (Quadro 1), sendo a maioria das espécies conhecida por análises independentes de cultivo. Isso porque as BMs são organismos extremamente fastidiosos (Abreu *et al.*, 2020), necessitando de condições físico-químicas específicas para sua sobrevivência, não resistindo a grandes variações de pH, temperatura e principalmente oxigênio, o que dificulta seu isolamento e crescimento em meios de cultura.

Quadro 1 – Exemplos de cepas já cultivadas de BMs.

Grupo Filogenético	Bactéria Magnetotática	Referência
Alphaproteobacteria	<i>Ca. Terasakiella sp.</i> cepa SH-1	Du <i>et al.</i> , 2019
	<i>Ca. Terasakiella magnetica</i> cepa PR-1	Monteil <i>et al.</i> , 2018
	<i>Magnetospira sp.</i> cepa QH-2	Zhu <i>et al.</i> , 2010
	<i>Magnetospira thiophila</i> cepa MMS-1	Bazyliński <i>et al.</i> , 2007
	<i>Magnetospirillum sp.</i> cepa ME-1	Ke <i>et al.</i> , 2017
	<i>Magnetospirillum sp.</i> cepa XM-1	Wang <i>et al.</i> , 2016
	<i>Magnetospirillum caucaseum</i> cepa SO-1	Gouzdev <i>et al.</i> , 2014
	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> cepa MSR-1	Schleifer <i>et al.</i> , 1991
	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> cepa AMB-1	Matsunaga <i>et al.</i> , 1991
	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> cepa MS-1	Blakemore <i>et al.</i> , 1981
	<i>Magnetospirillum marisnigri</i> cepa SP-1	Dziuba <i>et al.</i> , 2016
	<i>Magnetospirillum moscoviense</i> cepa BB-1	Dziuba <i>et al.</i> , 2016
	<i>Magnetovibrio blakemorei</i> cepa MV-1	Bazyliński <i>et al.</i> , 2013
<i>Ca. Etaproteobacteria</i>	<i>Magnetococcus marinus</i> cepa MC-1	Schübbe <i>et al.</i> , 2009
	<i>Magnetococcus massalia</i> cepa MO-1	Lefèvre <i>et al.</i> , 2009
	<i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1	Morillo <i>et al.</i> , 2014
Deltaproteobacteria	<i>Desulfamplus magnetomortis</i> cepa BW-1	Lefèvre <i>et al.</i> , 2011
	<i>Desulfovibrio sp.</i> cepa DV	Kovaliova <i>et al.</i> , 2017
	<i>Desulfovibrio magneticus</i> cepa RS-1	Nakazawa <i>et al.</i> , 2009
Gammaproteobacteria	<i>Gamma proteobacterium</i> cepa BW-2	Lefèvre <i>et al.</i> , 2011
	<i>Gamma proteobacterium</i> cepa SS-5	Lefèvre <i>et al.</i> , 2011

Apesar de meios de cultivo já estarem otimizados e padronizados para algumas BMs (Heyen e Schüler, 2003), em geral, os meios utilizados hoje para cultivar BMs a partir de amostras ambientais são compostos, na maior parte, por componentes genéricos (Schüler, 1999; Lefèvre *et al.*, 2009). Isso, dada a diversidade metabólica desses organismos, dificulta seu isolamento e cultivo. Também, ao tentar isolar BMs do ambiente em meio de cultura, outros microrganismos menos exigentes presentes na amostra podem se tornar prevalentes, dificultando ainda mais o isolamento, mesmo após a realização de procedimentos de purificação das BMs.

Dessa forma, a busca por novas espécies de BMs em locais pouco explorados nesse âmbito se torna necessária, a fim de aumentar a probabilidade de encontrar cepas que sejam facilmente cultiváveis, além de eficientes na produção e extração dos magnetossomos. Um desses ambientes é a Mata Atlântica brasileira, onde não há estudos sobre a diversidade de BMs, principalmente em áreas de conservação do bioma, como é o Parque Nacional da Tijuca, no Rio de Janeiro.

1.5 Mata Atlântica e o Parque Nacional da Tijuca

A Mata Atlântica é uma floresta ombrófila com vegetação, de folhas largas e perenes, densa, o que contribui diretamente para que seu microclima seja fresco, com médias de 25 °C, e úmido, com 0 a 60 dias secos no ano, com efeito, também, da evapotranspiração das plantas, fazendo com que praticamente não haja períodos biologicamente secos (Veloso *et al.*, 1992), sem grandes variações nas condições durante o ano.

Esse bioma é considerado a segunda maior floresta tropical no Brasil, após a floresta amazônica, estendendo-se da região sul ao nordeste ao longo do litoral brasileiro (Por, 1992). No entanto, devido a fatores antrópicos, principalmente o avanço da urbanização, apenas resta uma pequena porcentagem da cobertura original desse bioma. Mesmo com o estado avançado da destruição desse bioma, a mata atlântica ainda abriga uma grande diversidade biológica, contando com um alto número de espécies endêmicas, sendo classificada como um *hotspot* mundial, uma área com rica diversidade e alto nível de ameaça, sendo prioridade de conservação (Rezende *et al.*, 2018).

Algumas áreas da mata atlântica presentes na cidade do Rio de Janeiro compõem o Parque Nacional da Tijuca (PNT), uma unidade de conservação (UC) federal, composto por quatro setores: Pedra da Gávea, Serra da Carioca, Floresta da Tijuca e Pretos Forros/Covanca. Por ser uma UC, é proibida a construção e desmatamento, entre outras atividades, dentro da floresta (Brasil, 2000).

O PNT abriga uma variedade de rios e riachos que desempenham um papel crucial no ecossistema local. Esses corpos d'água possuem características únicas que contribuem para a diversidade e a saúde dos ecossistemas aquáticos do parque. Os rios são alimentados por fontes de água provenientes das montanhas circundantes, como o Pico da Tijuca e a Pedra da Gávea. Essas fontes de água fornecem um fluxo constante ao longo do ano, contribuindo para a manutenção dos ecossistemas aquáticos e o fornecimento de água não só para a fauna e flora local, como também para diversos bairros vizinhos (Parque Nacional da Tijuca, 2020).

Essa topografia montanhosa também influencia a formação dos rios, que formam meandros por vales estreitos e desfiladeiros, criando uma variedade de habitats, como corredeiras, quedas d'água e pequenas piscinas naturais. Esses diferentes habitats aquáticos abrigam uma variedade de espécies de plantas, animais e microrganismos adaptados às condições específicas de cada local (Por *et al.*, 1992; Rezende *et al.*, 2018). As pequenas piscinas, que não possuem grande turbulência, podem fornecer as condições microaerófilas ideais para BMs.

As águas do PNT geralmente apresentam características organolépticas limpa e clara devido à proteção ambiental e à gestão adequada da área. No entanto, a urbanização e as atividades humanas próximas ao parque podem representar desafios para a manutenção da qualidade da água, exigindo medidas de conservação e monitoramento contínuos (Rezende *et al.*, 2018).

Dessa forma, os rios e riachos do PNT, caracterizados por seu fluxo constante de água, topografia montanhosa, vegetação ribeirinha e biodiversidade aquática significativas e qualidade da água preservada, desempenham um papel vital na sustentação da vida selvagem, na conservação da biodiversidade e na oferta de recursos hídricos para a região. A proteção e a gestão adequada desses corpos d'água são fundamentais para a preservação dos ecossistemas do parque, e pesquisar sobre a biodiversidade local é um passo para o entendimento sobre a fauna e flora que leva à criação de medidas para essa proteção.

1.6 BMs no PNT

Atualmente, não há estudos sobre a diversidade de BMs dentro do PNT. Pelo potencial biotecnológico das BMs, seu papel importante nos ciclos biogeoquímicos e na ecologia de ambientes aquáticos, além da importância do conhecimento da biodiversidade, não só em áreas de conservação, mas na Mata Atlântica como bioma, este se torna um estudo piloto para que esses organismos sejam mais explorados no PNT e ao longo da Floresta Atlântica brasileira, encorajando a descoberta de novas espécies, aumentando as possibilidades em relação a novas tecnologias e ferramentas baseadas nas BMs e seus magnetossomos.

2 JUSTIFICATIVA

O PNT é um ambiente rico em biodiversidade, abrigando uma variedade de espécies de plantas, animais e microrganismos e servindo como objeto de estudo para diversas áreas. Essa diversidade está presente, além da terra, na água. Os rios e riachos do PNT são ambientes complexos, com uma rica diversidade de animais aquáticos e, também, de microrganismos. No entanto, esses rios são pouco explorados em termos de diversidade microbiana e não existem estudos relacionados à presença e diversidade de BMs nesses ambientes. As BMs são geralmente descritas com um papel importante nos ecossistemas aquáticos, influenciando na ciclagem de nutrientes, principalmente ferro, e no equilíbrio ecológico. Estudar BMs nos riachos do PNT pode fornecer informações sobre sua distribuição, abundância e interações com outros organismos e com o ambiente, contribuindo para a compreensão do funcionamento desses ecossistemas e do papel que as BMs desempenham neles.

Além disso, estudos dessa natureza podem propiciar a prospecção de organismos com potencial biotecnológico. Como mostrado pela baixa quantidade de BMs cultivadas hoje, os locais mais estudados com o objetivo de bioprospecção e cultivo não possuem bons resultados nesses âmbitos. Dessa forma, explorar um ambiente novo, sem estudos prévios, pode fornecer resultados positivos, fazendo com que esforços futuros se concentrem nas novas áreas caracterizadas.

Assim, entender a ecologia de BMs em ambientes como o PNT é um passo necessário para a sua bioprospecção e pode contribuir para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras em diversas áreas, como medicina, nanotecnologia e meio ambiente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterização morfológica independente de cultivo de estirpes de BMs no sedimento de rios do PNT, visando à análise da diversidade morfológica desses organismos e estabelecimento de uma relação entre a presença de certos morfotipos e fatores abióticos no ambiente, gerando uma base para a bioprospecção de BMs no PNT e para a projeção de ensaios futuros com a finalidade de cultivar em laboratório novas espécies de BMs que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas.

3.2 Objetivos específicos

- I) Coleta de amostras de sedimento e água em diferentes áreas de rios do PNT;
- II) Análise de fatores abióticos na água dos rios;
- III) Detecção de bactérias magnetotáticas;
- IV) Caracterização morfológica e ultraestrutural das estirpes selecionadas;
- V) Análise da diversidade morfológica de BMs nos pontos de amostragem.
- VI) Relacionamento da diversidade morfológica com fatores abióticos no ambiente;
- VII) Cultivo de estirpes de BMs selecionadas em meios específicos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Dentro do PNT existem 32 rios e riachos (Figura 7), cujos fluxos de água dependem diretamente da quantidade de chuvas no período, variando entre as estações do ano. Esses cursos d'água, em geral, possuem larguras e profundidades pequenas. Em alguns pontos do PNT, os rios formam quedas d'água, e poços, permitindo a ocupação por banhistas e comumente utilizados como atração para visitantes.

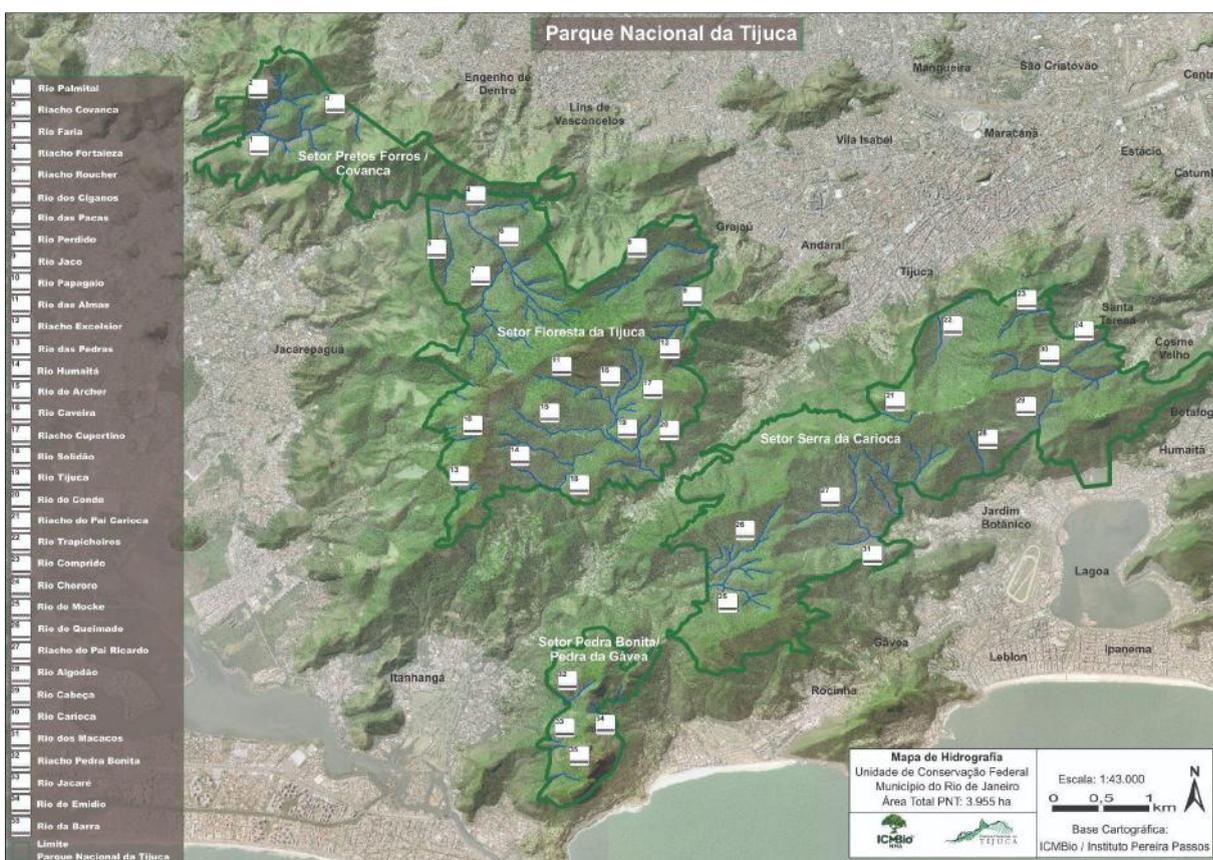


Figura 7 – Mapa do Parque Nacional da Tijuca mostrando os rios e riachos presentes na floresta, destacada em verde. Imagem retirada do site do Parque Nacional da Tijuca (2020).

Foram realizadas quatro coletas em dois rios do PNT: Rio das Almas e Rio das Trapicheiros (Figura 8), em duas épocas no ano: verão, em dezembro de 2021, dezembro de 2022 e fevereiro de 2023, e outono, em maio de 2023 (Quadro 2). Dos três pontos escolhidos para amostragem em cada rio, um corresponde a áreas sem a presença de banhistas, enquanto os dois restantes têm influência de utilização recreacional pela população.

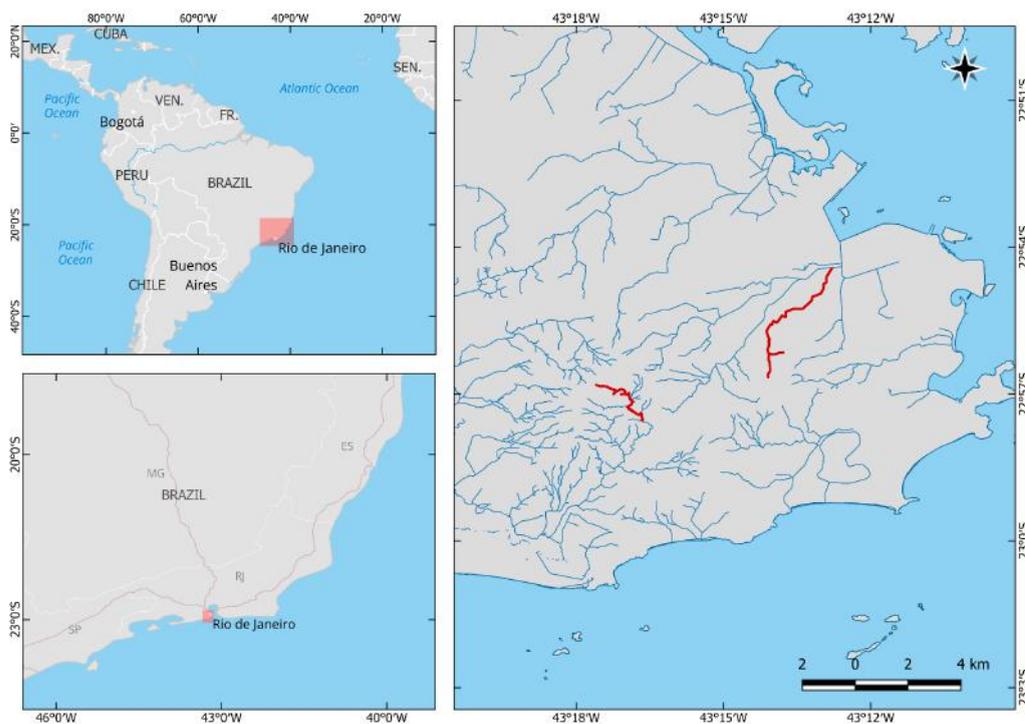


Figura 8 – Mapa da cidade do Rio de Janeiro com o Rio das Almas, à esquerda, e Rio Trapicheiros, à direita, destacados em vermelho.

Quadro 2 – Pontos de amostragem e análises realizadas em cada data de coleta.

Data	Pontos	Amostragem de	Análise
dez./2021	P6	Sedimento	BMs
dez./2022	P6	Sedimento	BMs
fev./2023	P1 a P5	Sedimento e Água	BMs, Fatores abióticos
mai./2023	P1 a P6	Sedimento e Água	BMs, Fatores abióticos

Como parte da caracterização do ambiente, foram baixados dados pluviométricos do sistema Alerta Rio da Prefeitura do Rio de Janeiro dos meses de coleta, a fim de determinar se as chuvas poderiam afetar a diversidade de BMs. Foi desenhado um fluxograma das etapas de coletas e análises realizadas, encontrado no Apêndice A.

4.1.1 Rio das Almas

O Rio das Almas (Figura 9) tem sua nascente no setor Floresta da Tijuca do PNT, no bairro do Alto da Boa Vista ($22^{\circ}95' S$, $43^{\circ}29' W$), por onde corre até se juntar ao Rio Caveira, formando o Rio Tijuca, que se estende até o bairro da Barra da Tijuca, onde deságua na Lagoa da Barra. No Rio das Almas está localizada a Cachoeira das Almas, atração para visitantes, que podem entrar na água e se banhar. A maior parte do rio é coberta por árvores, fazendo com que sua água permaneça em uma temperatura amena. As dimensões de largura e profundidade do rio são pequenas, com largura variável de poucos metros, facilitando o estudo do ambiente. Os pontos escolhidos para a amostragem variam entre as altitudes de 500 e 610 m em relação ao nível do mar (Tabela 1).

Tabela 1 – Coordenadas e altitude dos pontos de amostragem no Rio das Almas.

Ponto de Amostragem	Latitude (°)	Longitude (°)	Altitude (m)
P1	-22,948543	-43,287105	609
P2	-22,948443	-43,285168	571
P3	-22,951204	-43,281886	512

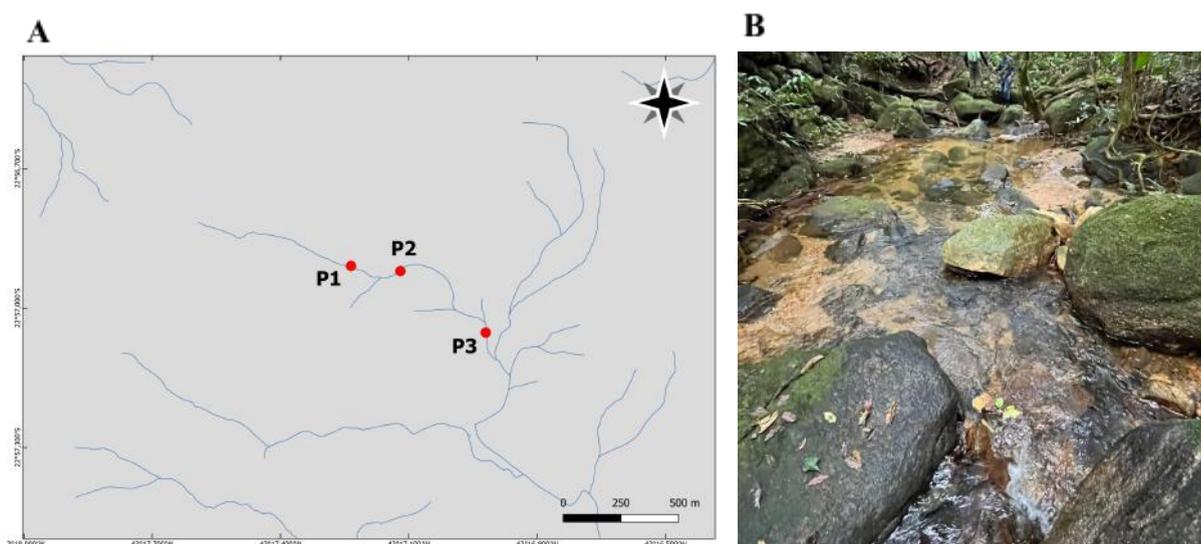


Figura 9 – **A.** Rio das Almas com os pontos de amostragem em vermelho. O sentido da corrente do rio é de P1 a P3. O ponto P1 está localizado um pouco antes da Cachoeira das Almas, enquanto o P2 se localiza após a cachoeira. **B.** Foto tirada no Rio das Almas.

4.1.2 Rio Trapicheiros

O Rio Trapicheiros (Figura 10) é um corpo d'água que nasce no Maciço da Tijuca, no setor Serra da Carioca do PNT, no bairro da Tijuca ($22^{\circ}94' S$, $43^{\circ}23' W$), se estendendo por 6,19 km até o bairro Estácio, onde deságua no Rio Maracanã, que tem sua foz na Baía de Guanabara. O Rio Trapicheiros possui, em seu início, uma pequena represa, usada antigamente para abastecer casas na região. Hoje, a área é utilizada por banhistas para nadar, e a presença de animais domésticos é comum. Além disso, em volta da represa, estão presentes casas cujos moradores consomem a água do rio. Os pontos escolhidos para a amostragem variam entre as altitudes de 100 e 135 m em relação ao nível do mar.

Tabela 2 – Coordenadas e altitude dos pontos de amostragem no Rio Trapicheiros.

Ponto de Amostragem	Latitude (°)	Longitude (°)	Altitude (m)
P4	-22,938217	-43,234725	132
P5	-22,936817	-43,234356	106
P6	-22,935863	-43,235016	101

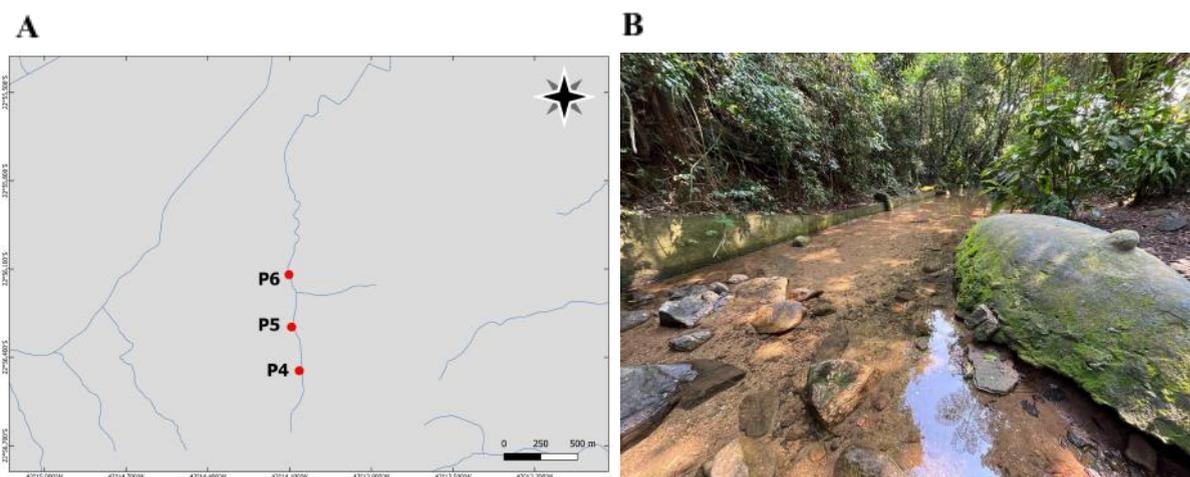


Figura 10 – **A.** Rio Trapicheiros com os pontos de amostragem em vermelho. O sentido da corrente do rio é de P4 a P6. O ponto P6 corresponde à barragem presente no rio. Banhistas foram observados em P5 e P6. **B.** Foto tirada no Rio Trapicheiros, no P6.

4.2 Amostragem e transporte

Amostras de sedimento e água foram coletadas nos pontos marcados nas figuras 9 e 10 a fim de caracterizar o ambiente e as BMs nele presentes.

Para a análise físico-química da água e para contagem de bactérias e vírus, foram coletadas amostras de água utilizando tubos tipo Falcon autoclavados. A fixação dos microrganismos para contagem foi realizada no local de amostragem em tubos de criogenia, que foram armazenados em nitrogênio líquido até o momento da análise em laboratório.

A amostragem de sedimento foi feita utilizando potes plásticos de 500 mL, retirando-se os primeiros 5 cm de sedimento do assoalho dos riachos, observando-se um volume de água para a cobertura do sedimento no recipiente, deixando um *headspace* com ar. Os potes foram, então, levados ao laboratório, onde foram mantidos em temperatura ambiente até a concentração e análise das BMs.

4.3 Concentração Magnética de BMs

Foram posicionados dois ímãs com polaridades opostas em pontos opostos de cada recipiente contendo as amostras ambientais, visando atrair as BMs, concentrando-as na região próxima ao ímã (Figura 11). Depois de um intervalo entre 30 minutos e 1 hora, alíquotas de água com as células concentradas foram retiradas de perto do ímã e transferidas para microtubos de 1,5 mL e concentradas novamente com ímãs por mais 10 minutos, a fim de aumentar ainda mais a concentração de BMs.

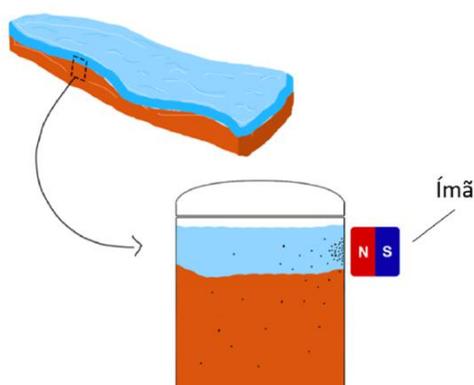


Figura 11 – Recipiente de amostragem de amostra com indicação do assoalho do rio e um ímã posicionado na lateral do pote, onde se observa a concentração de BMs.

4.4 Caracterização morfológica

4.4.1 Microscopia óptica

Para visualizar em um microscópio o movimento das bactérias e sua reação ao campo magnético, foi feita a microscopia óptica utilizando a técnica de gota pendente com as BMs previamente concentradas magneticamente, ou a partir de tubos com meio de cultura.

4.4.1.1 Gota pendente

Para a montagem da gota pendente (Figura 13), um espaçador de borracha em formato de anel é posicionado entre uma lâmina de microscopia e uma lamínula de vidro contendo gotas de 2 μL com alíquotas com BM concentradas. As gotas são posicionadas na lamínula de modo a fazer com que elas fiquem pendentes.

As lâminas foram levadas para os microscópios Zeiss Axioplan 2 ou Zeiss Axio Imager.D2 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e foram visualizadas em aumento máximo de 1000x utilizando contraste diferencial interferencial (DIC, do inglês *Differential interference contrast*). Durante a visualização, um ímã foi posicionado perto da lâmina e movimentado, observando-se a reação das bactérias à variação no campo magnético. Durante o processo, foram feitas fotografias e filmagens dos organismos utilizando as câmeras AxioCam MRc no Axioplan 2 e AxioCam HRm no Axio Imager.D2. As fotografias foram processadas utilizando o software Adobe Photoshop 2021 e as filmagens com o Adobe Premiere Pro 2021 (Adobe Inc., CA, EUA).

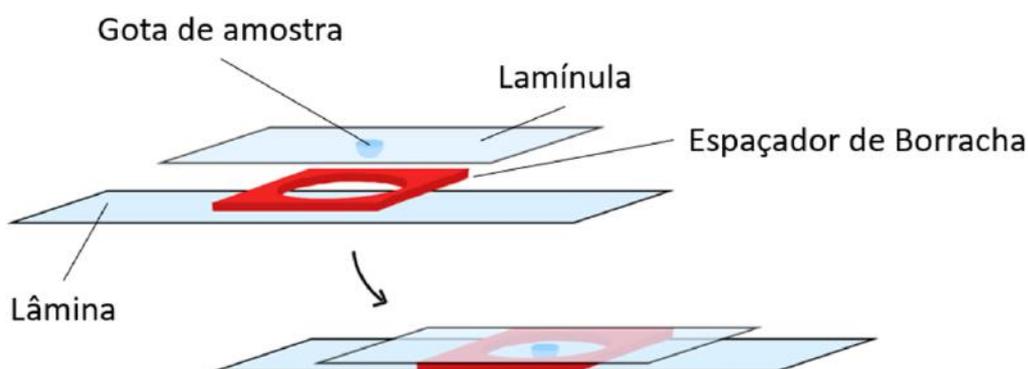


Figura 12 – Esquema de montagem da lâmina de microscopia para o uso da técnica da gota pendente.

4.4.2 Caracterização da ultraestrutura

Das amostras observadas, foram selecionadas as com a maior quantidade de BMs para facilitar as análises de caracterização.

4.4.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Foram depositadas gotas de 5 μL contendo BMs em grades de cobre 300 *mesh* revestidas com filme de formvar e carbono, que foram posicionadas ao lado de um ímã (Figura 14). Após 5 minutos, a gota foi seca utilizando papel filtro. As grades permanecerão em dessecador a vácuo por uma semana. Depois de secas, as grades foram inseridas em um microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni (FEI Company, Hillsboro, OR, EUA), com o qual foram obtidas imagens com voltagem de aceleração de 80 kV utilizando a câmera MegaView G2. As imagens foram processadas usando o programa Adobe Photoshop 2021.

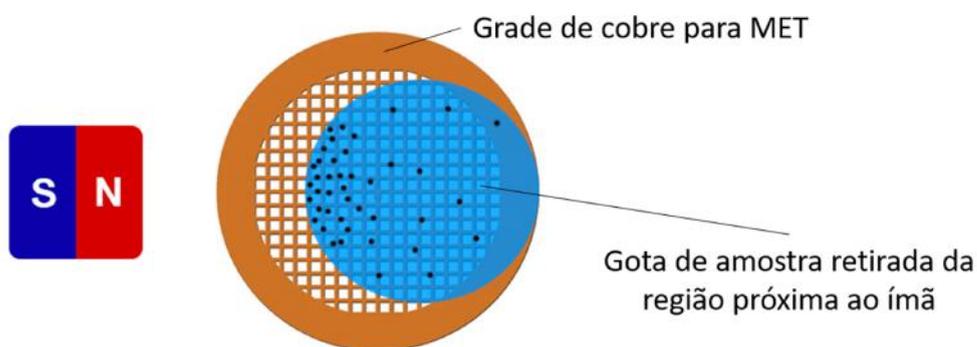


Figura 13 – Grade de cobre próxima a um ímã contendo uma gota com BMs enriquecidas magneticamente.

4.4.2.2 Caracterização e quantidade de magnetossomos e grânulos

A quantificação e medição da largura, comprimento e fator de forma ($\frac{\text{largura}}{\text{comprimento}}$) dos magnetossomos foram realizadas manualmente a partir das imagens obtidas por MET, com o uso do software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). A caracterização morfológica dos magnetossomos foi feita com base nas seguintes classificações: octaédrico; cuboctaédrico truncado; prismático ou pseudo-hexagonal alongado; e anisotrópica (Figura 15).

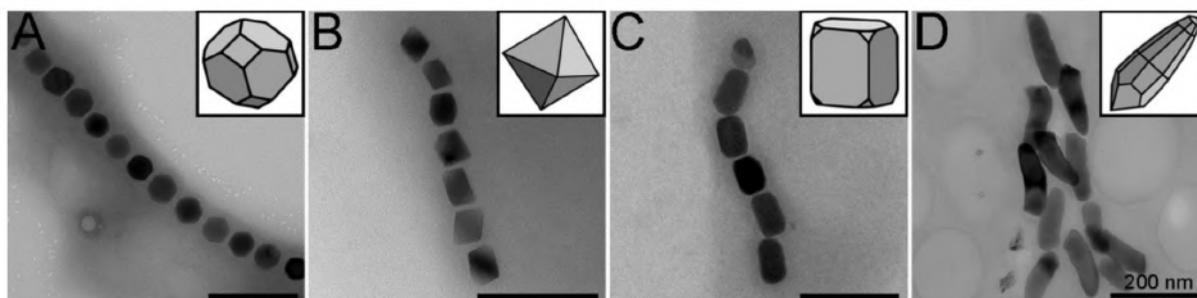


Figura 14 – Diversidade morfológica de magnetossomos. **A.** Magnetossomos cubo-octaédricos alinhados em cadeia em espirilo não cultivado de amostras coletadas no rio Ubatiba (Maricá – RJ). Ilustração inserida: morfologia cristalina cubo-octaédrica. **B.** Magnetossomos octaédricos alinhados em cadeia em vibrião não cultivado encontrado em amostras coletadas no Saco do Mamanguá (Paraty Mirim – RJ). Ilustração inserida: morfologia cristalina octaédrica. **C.** Magnetossomos com morfologia prismática alongada ou pseudo-hexagonal organizados em cadeia em um vibrião não cultivado encontrado em amostras coletadas no Saco do Mamanguá (Paraty Mirim – RJ). Ilustração inserida: morfologia cristalina prismática. **D.** Seção de um corte ultrafino de um bastonete não cultivado encontrado em amostras provenientes do rio Ururá (Campos dos Goytacazes – RJ) contendo magnetossomos com morfologia anisotrópica. Ilustração inserida: morfologia cristalina anisotrópica. Todas as imagens foram obtidas do acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia do IMPG, UFRJ. Figura retirada de Taveira (2020).

4.3.2 Racetrack (RT)

O RT (Figura 12) consiste no deslocamento ativo de BMs através da seção fina de uma pipeta Pasteur de vidro com algumas adaptações, a fim de separar as BMs das bactérias não magnetotáticas (Wolfe *et al.*, 1987).

4.3.2.1 Construção do aparato de RT

Para adaptar a pipeta, sua porção de maior diâmetro é cortada a cerca de 5 cm do local onde a pipeta se estreita. A extremidade de menor diâmetro é selada com fogo e uma camada fina de algodão é posicionada na região onde se inicia o estreitamento da pipeta. O algodão deve ser posicionado de forma a não ter uma grande densidade, o que impediria a passagem de BMs, mas também não podem ficar tão soltos, possibilitando a passagem de todos os organismos. O tamanho do algodão e sua compactação são controlados manualmente. Os aparatos são autoclavados a 120 °C por 20 minutos e mantidos em recipiente fechado até a utilização.

4.3.2.2 Concentração das BMs

Para separar as BMs dos outros organismos e as concentrar, entre 400 e 600 μL de água do ambiente previamente autoclavada e filtrada em filtro de 0,22 μm estéril foram adicionados a parte fina da pipeta pasteur para criar um microambiente para o qual as BMs possam ser direcionadas. Então, entre 200 e 400 μL do concentrado de bactérias obtido a partir da amostra ambiental foram adicionados no aparato de RT. Esse aparato foi então posicionado com a parte mais fina na frente de um ímã.

Após 5 a 15 minutos, espera-se que as BMs estejam na extremidade da pipeta próxima ao ímã, enquanto as bactérias não magnetotáticas estejam próximas ao início da pipeta e os organismos maiores, presos no filtro de algodão. A partir disso, foi realizada uma quebra da pipeta e amostragem do líquido perto do ímã, a fim de inocular as BMs possivelmente isoladas em meio de cultivo, assim como utilizá-las para análises por microscopia em que são desejadas amostras com células filtradas.

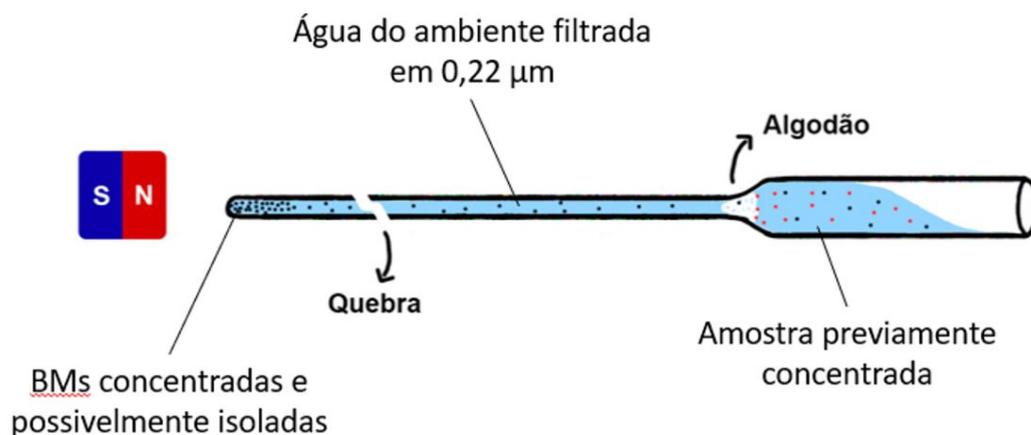


Figura 15 – Aparato de RT posicionado ao lado de um ímã. Estão representadas as BMs (pontos pretos) e bactérias não-magnetotáticas (pontos vermelhos) na água (em azul).

4.6 Cultivo de BMs

Após a concentração das BMs, foi realizada sua inoculação em diferentes meios de cultura semissólidos com gradiente de oxigênio para BMs de água doce adaptados de Blakemore (1979), com composição variável, tanto para organismos autotróficos quanto heterotróficos (Apêndice B). Na composição, diferentes fontes de nitrogênio e carbono foram testadas, além de diferentes valores de pH, em torno do pH medido no ambiente. Após o RT, entre 20 e 50 μL do líquido contendo as BMs foram inoculados na IOA dos tubos contendo os meios (Figura 16). Os tubos foram, então, incubados a 28 °C por duas semanas (Morillo, 2014).

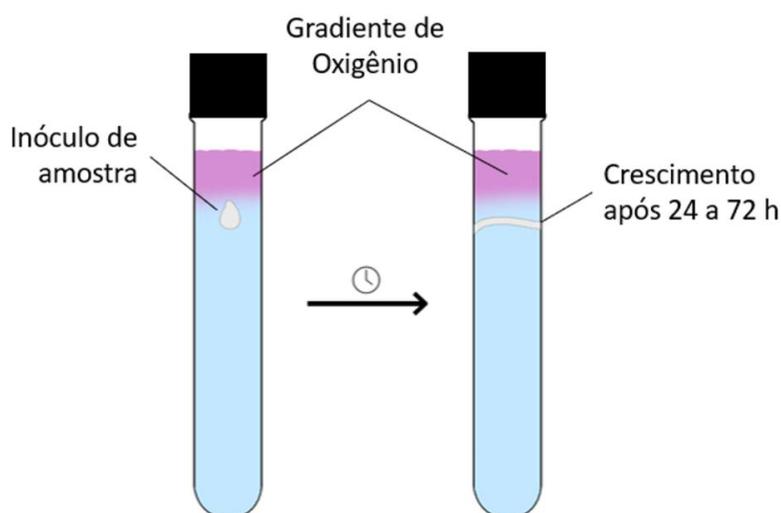


Figura 16 – Tubo contendo o meio de cultura e o inóculo inicial de BMs. Com o passar do tempo, as BMs formam uma faixa de crescimento próxima à IOA.

4.7 Citometria de fluxo

Para avaliação da abundância de procariotos totais (APT), amostras foram fixadas com uma mistura de paraformaldeído 1% + glutaraldeído 0,05% (adaptado de Gasol e del Giorgio, 2000). A citometria, assim como a microscopia de epifluorescência, não distingue bactérias de arqueias, então, para este projeto, todos os procariotos foram contados como procariotos totais. A fixação das amostras foi feita na região de coleta, seguida de congelamento em nitrogênio líquido, onde foram mantidas até a análise.

Uma vez em laboratório, as amostras para APT foram descongeladas e coradas com SYBR Green I (Molecular Probes), em uma concentração final de 5×10^{-5} da solução

estoque comercial (Brussaard *et al.*, 2004), e analisadas usando um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) equipado com um laser de íon argônio resfriado a ar que emite a 488 nm à potência de 20 mW, com alinhamento de laser e componentes ópticos fixos e *nozzle* de 70 µm. Água Milli-Q (18,2 mΩ) foi utilizada como fluido carreador. Grupos procarióticos foram detectados e quantificados com base na intensidade de fluorescência em um gráfico de dispersão lateral (eixo X, relacionado pelo tamanho) versus fluorescência verde (eixo Y, fluorescência verde de SYBR Green I, relacionada ao conteúdo de ácido nucleico).

4.8 Análise de nutrientes

As análises de nutrientes foram realizadas usando um analisador automático Seal Auto Analyzer 3 (AA3). Os nutrientes foram mensurados pelos métodos convencionais da oceanografia. Dessa forma, seguindo Grasshoff *et al.* (1999), o ortofosfato foi determinado pelo método fosfomolibídico; o fósforo total nas amostras foi digerido em meio ácido com persulfato de potássio, e determinado pelo método anterior; o nitrito foi determinado pelo método da diazotação; o nitrato foi determinado por redução em coluna de Cd-Cu seguido de diazotação; o nitrogênio total nas amostras foi digerido por persulfato, e determinado pelo método anterior; e o silicato foi determinado pelo método silicomolibídico. Além desses, o nitrogênio amoniacal (amônia) foi determinado pelo método do azul de indofenol (Parsons *et al.*, 1984).

O nitrogênio orgânico (Norg) foi determinado a partir da subtração do nitrogênio inorgânico total (NIT, somatório da amônia, nitrito e nitrato) do nitrogênio total. Assim como o Norg, o fósforo orgânico (Porg) foi determinado a partir da subtração do ortofosfato do fósforo total. As análises de salinidade foram realizadas pelo método da clorinidade. Já o oxigênio dissolvido (OD) foi obtido através do método titulométrico de Winkler (Strickland e Parsons, 1972).

4.9 Estatística

Cálculos de regressão linear, desvio padrão, teste de Mann-Whitney e coeficiente de correlação de Spearman (r_s) foram feitos no software QtiPlot v0.9.8.6 (IONDEV, 2015). O nível de significância α foi considerado como 5%.

Erros em cálculos a partir de medições foram obtidos utilizando a equação de propagação de incertezas:

$$\delta f = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \times \delta x_i \right)^2}$$

onde f é a o parâmetro calculado, δf é o erro do parâmetro, x_i é um parâmetro do qual f depende e n é o número de parâmetros dos quais f depende.

O erro de parâmetros medidos manualmente foi definido em 1% do valor obtido.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do ambiente

5.1.1 Análise pluviométrica

A partir dos dados baixados do Alerta Rio, foi possível montar gráficos (Figura 17) mostrando a quantidade de chuva diária nos dias anteriores às amostragens de 2023. Também foram analisadas as precipitações de dezembro de 2021 e 2022. Em 2021, o mesmo padrão de coleta após pico de precipitação foi observado. No entanto, em 2022, não foi possível obter uma data exata de coleta. Assim, não foi possível observar o padrão.

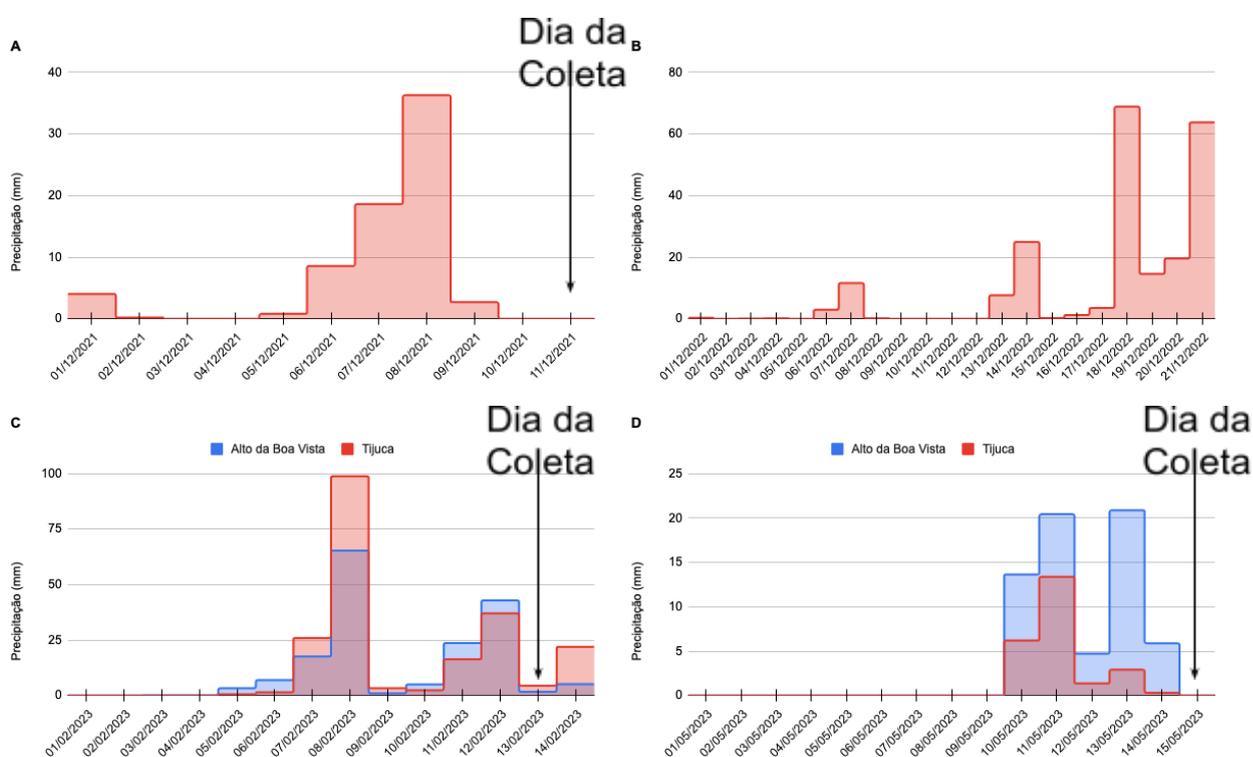


Figura 17 – Precipitação medida nas estações meteorológicas mais próximas aos locais de amostragem. **A.** Chuvas em dezembro de 2021 até a coleta no dia 11. **B.** Chuvas em dezembro de 2022. A coleta foi realizada antes do dia 20, porém, não foi possível obter uma data exata. **C.** Chuvas em fevereiro de 2023 até a coleta no dia 13. **D.** Chuvas em maio de 2023 até a coleta no dia 15.

5.1.2 Análise físico-química dos rios

Os parâmetros físico-químicos analisados nas amostras de água dos rios não tiveram diferenças significativas entre os pontos de coleta, com exceção do P6, que teve uma concentração de nitrato de aproximadamente 5 vezes maior ($p = 1,3\%$), e de silicato, 2,5 vezes maior ($p = 1,3\%$) que nos outros pontos do mesmo rio, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos valores dos parâmetros físico-químicos medidos em cada coleta.

Local	Rio	Rio das Almas					
	Ponto de Amostragem	P1		P2		P3	
	Data da Amostragem	fev./2023	mai./2023	fev./2023	mai./2023	fev./2023	mai./2023
Parâmetro	Temperatura (°C)	21,6	18,3	21,3	18,3	21,5	19,0
	pH	6,67	6,20	5,90	6,20	5,90	5,90
	OD (mg/L)	8,84	8,80	8,86	7,70	8,76	8,10
	Dureza (ppm CaCO ₂)	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
	Amônia (µM)	1,768 ± 0,033	1,675 ± 0,005	1,364 ± 0,005	1,165 ± 0,005	1,743 ± 0,01	1,167 ± 0,016
	Nitrito (µM)	0,322 ± 0,002	0,114 ± 0,001	0,354 ± 0,006	0,129 ± 0,001	0,44 ± 0,01	0,167 ± 0,003
	Nitrato (µM)	13,85 ± 0,325	16,887 ± 0,141	10,174 ± 0,304	16,946 ± 0,163	14,424 ± 0,337	22,416 ± 0,365
	N Total (µM)	17,227 ± 0,037	22,436 ± 0,054	13,806 ± 0,015	23,2 ± 0,046	18,632 ± 0,302	27,822 ± 0,62
	Ortofosfato (µM)	0,141 ± 0,001	0,137 ± 0,002	0,086 ± 0,001	0,131 ± 0,001	0,202 ± 0,003	0,112 ± 0,001
	P Total (µM)	0,305 ± 0,007	0,265 ± 0,001	0,3 ± 0,005	0,205 ± 0,005	0,283 ± 0,005	0,341 ± 0,007
Silicatos (µM)	3,084 ± 0,087	2,43 ± 0,033	0,764 ± 0,012	3,242 ± 0,024	1,756 ± 0,024	2,257 ± 0,049	
Local	Rio	Rio Trapicheiros					
	Ponto de Amostragem	P4		P5		P6	
	Data da Amostragem	fev./2023	mai./2023	fev./2023	mai./2023	fev./2023	mai./2023
Parâmetro	Temperatura (°C)	24,1	21,0	24,1	21,9	-	21,6
	pH	6,57	6,36	6,63	5,76	-	6,43
	OD (mg/L)	8,43	7,40	8,63	4,60	-	7,20
	Dureza (ppm CaCO ₂)	< 50	< 50	< 50	< 50	-	< 50
	Amônia (µM)	1,808 ± 0,01	2,049 ± 0,047	1,475 ± 0,032	1,556 ± 0,016	-	1,698 ± 0,033
	Nitrito (µM)	0,416 ± 0,008	0,228 ± 0,007	0,432 ± 0,008	0,233 ± 0,002	-	0,303 ± 0,004
	Nitrato (µM)	13,575 ± 0,012	23,298 ± 0,328	12,917 ± 0,16	16,546 ± 0,307	-	78,351 ± 1,911 *
	N Total (µM)	17,334 ± 0,084	26,703 ± 0,606	16,62 ± 0,317	22,281 ± 0,08	-	101,513 ± 0,603 *
	Ortofosfato (µM)	0,091 ± 0,002	0,14 ± 0,002	0,098 ± 0,001	0,1 ± 0,001	-	0,334 ± 0,003
	P Total (µM)	0,273 ± 0,004	0,216 ± 0,006	0,56 ± 0,006	0,283 ± 0,005	-	0,175 ± 0,001
Silicatos (µM)	6,417 ± 0,02	5,866 ± 0,086	7,95 ± 0,053	6,501 ± 0,035	-	17,848 ± 0,31 *	

* Diferença significativa pelo teste de Mann-Whitney; $p < 0,05$.

5.1.3 Contagem de procariotos totais

A contagem de procariotos totais por citometria de fluxo mostrou estabilidade espacial e variação temporal nos valores de abundância, como fica demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 – Abundância de Procariotos nos diferentes pontos de amostragem no verão (fev./2023) e outono (mai./2023).

		Procariotos Totais (1/mL)	
Rio	Ponto	fev./2023	mai./2023
Rio das Almas	P1	$1,10 \times 10^5$	$7,09 \times 10^4$
	P2	$1,04 \times 10^5$	$9,44 \times 10^4$
	P3	$1,06 \times 10^5$	$7,30 \times 10^4$
Rio Trapicheiros	P4	$2,65 \times 10^5$	$6,45 \times 10^4$
	P5	$1,98 \times 10^5$	$4,65 \times 10^4$
	P6	<i>sem dados</i>	$1,23 \times 10^5$

5.3 Diversidade morfológica de BMs

Tanto no Rio das Almas quanto no Rio Trapicheiros, foi identificado um número grande de BMs em todos os pontos de coleta (Quadro 3).

Quadro 3 – Quantidade relativa de BMs encontradas nos pontos de amostragem em cada data de coleta.

Ponto	Quantidade Relativa de BMs por Data			
	dez./2021	dez./2022	fev./2023	mai./2023
P1	-	-	+++	++
P2	-	-	++	++
P3	-	-	+++	++
P4	-	-	+	+
P5	-	-	+	+++
P6	+++	+++	-	+++

5.3.1 Rio das Almas

Em todos os pontos de amostragem nesse rio foi observado um grande número de BMs, apesar da prevalência de apenas uma morfologia (Figuras 18A e 18B). Nota-se a presença de BMs, aparentemente com morfologia de bacilo, com número variável de grânulos com um tamanho relativo grande, ocupando a maior parte do citoplasma. Além disso, observando as imagens por MET, fica evidente uma cadeia de magnetossomos de morfologia cuboetaédrica (Figuras 18C e 18D).

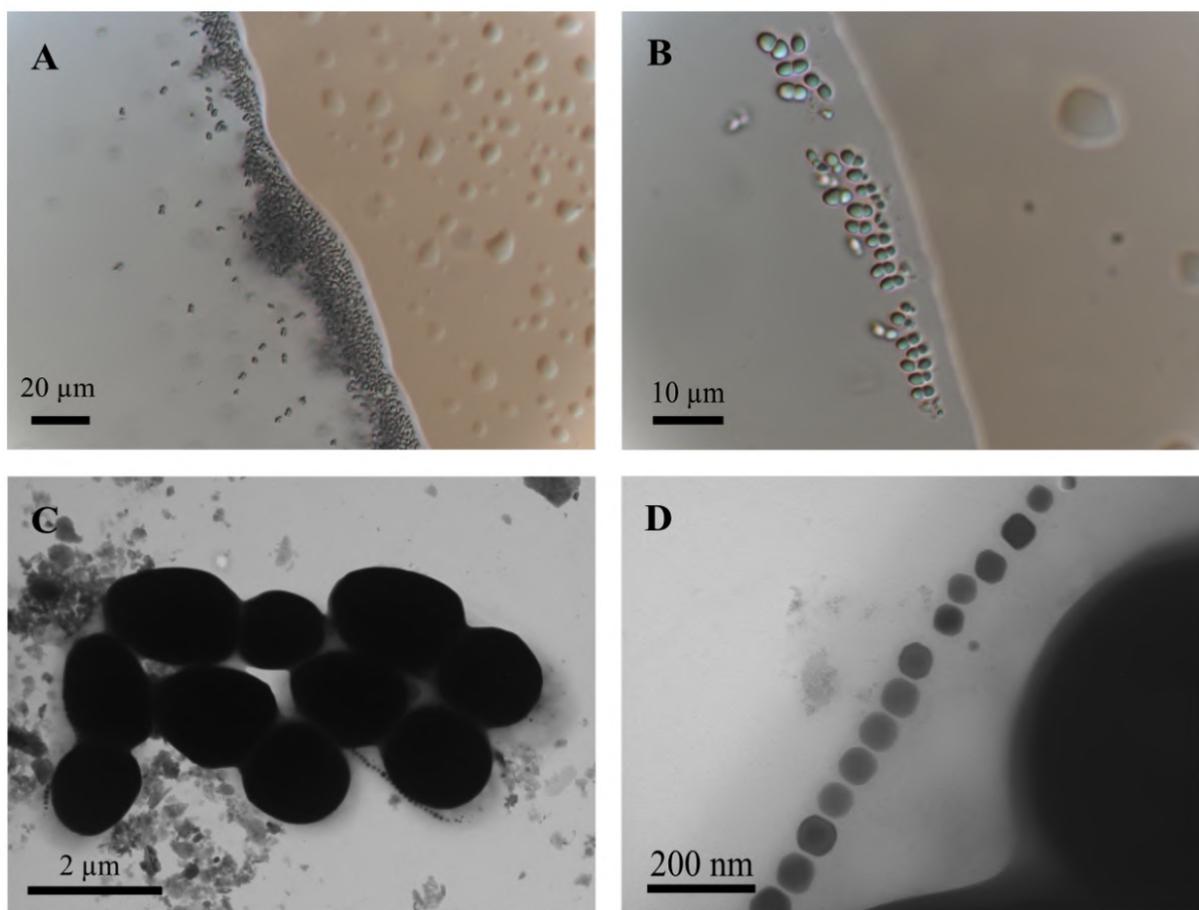


Figura 18 – BMs encontradas nas amostras do ponto P1. **A e B.** Microscopia óptica por DIC da gota pendente feita a partir do recipiente de coleta. **C.** MET de um grupo de BMs. É possível ver os grânulos e magnetossomos. **D.** Detalhe, por MET, da cadeia de magnetossomos de morfologia cubo-octaédrica de uma das BMs.

Os magnetossomos foram medidos com um tamanho médio de $66,3 \pm 1,4$ nm e fator de forma médio de $0,956 \pm 0,003$. Uma regressão linear realizada no gráfico de comprimento x largura dos magnetossomos revelou um coeficiente angular de $0,942 \pm 0,003$ e R^2 de 0,98 (Figura 19A). Além disso, a maior parte dos cristais possui o fator de forma próximo a 1 (Figura 19B).

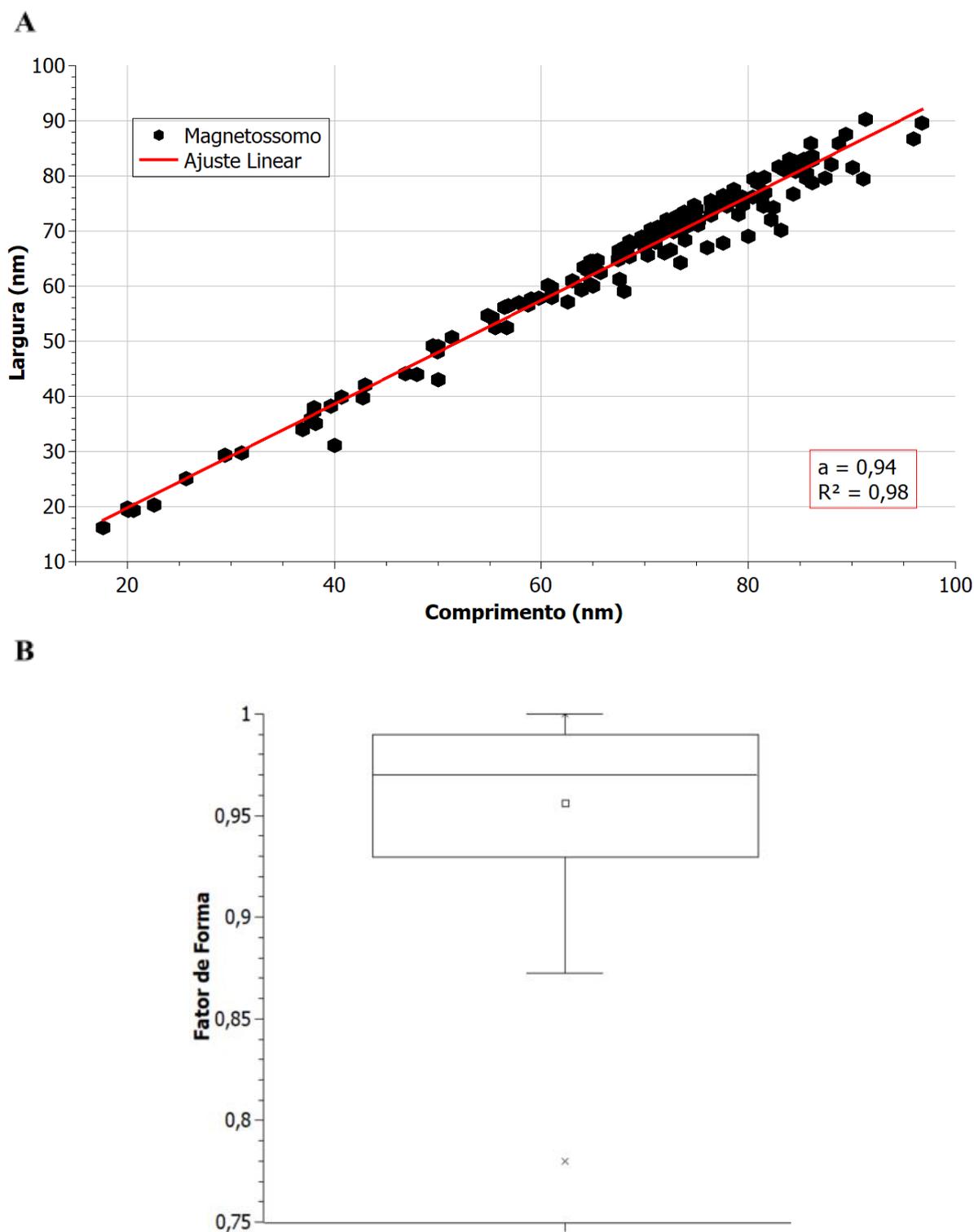


Figura 19 – **A.** Comprimento x Largura dos magnetossomos. A regressão linear com valores de $a = 0,942 \pm 0,003$ e $R^2 = 0,98$ indica uma alta simetria dos cristais. **B.** *Boxplot* dos fatores de forma, indicando uma distribuição não normal da simetria dos cristais, possuindo a maioria uma alta simetria.

A maior parte dos cristais, além de alta simetria, também possui um tamanho próximo à média (Figura 20), também mostrando uma distribuição não normal com a cauda esquerda indicando poucos cristais pequenos.

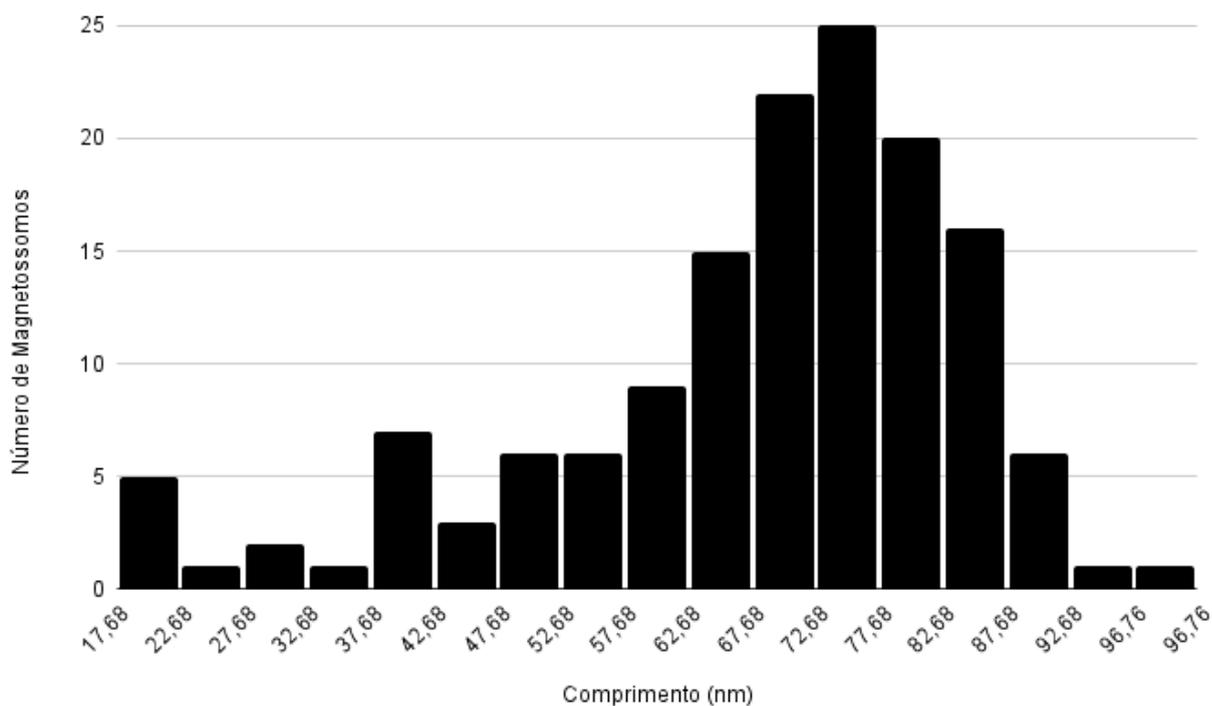


Figura 20 – Histograma dos comprimentos dos magnetossomos. Observa-se um pico nos maiores tamanhos, próximo à média, e uma cauda nos menores.

Plotando uma dispersão fator de forma x comprimento, observa-se uma aglomeração no quadrante superior direito (Figura 21), que indicaria uma tendência à maior simetria nos maiores cristais quando comparados aos menores. No entanto, o coeficiente de correlação de Spearman e valor de p mostram que a correlação não é significativa ($r_s = 0,04$ e $p = 9,86\%$).

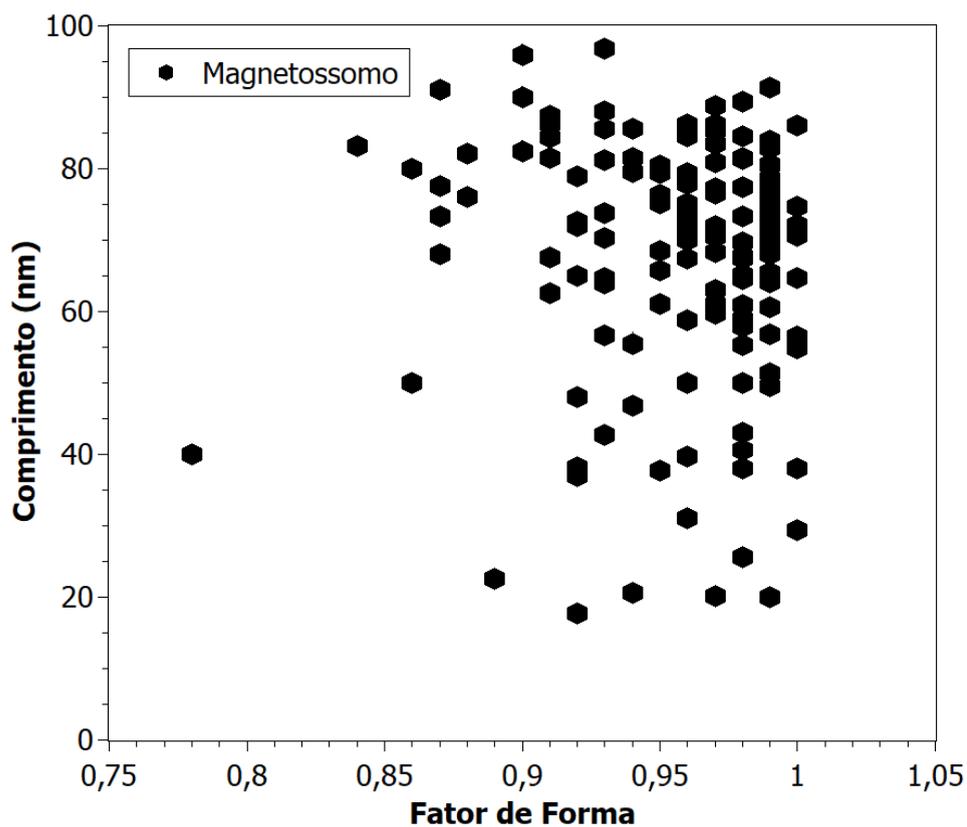


Figura 21 – Gráfico de dispersão do fator de forma x comprimento. Observa-se uma aglomeração no quadrante superior direito. Porém, testes estatísticos revelam que a correlação entre as duas variáveis não é significativa ($r_s = 0,04$ e $p = 9,86\%$).

Os grânulos presentes têm o formato elipsóide, com dimensão maior média de 986 ± 77 nm e dimensão menor média de 846 ± 59 nm, tendo as BMs observadas de um a quatro grânulos por célula e uma média de dois grânulos.

5.3.2 Rio Trapicheiros

Em dezembro de 2021, imagens do ponto de amostragem P6 revelaram a presença de um número grande de BMs na região (Figura 22A). A partir da obtenção de imagens em MET (Figura 23), foram observados diversos tipos morfológicos de BMs (cocos, espirilos, vibriões e bastonetes), variando em quantidade e formato de cristais. Ao observar no microscópio óptico a mesma amostra depois de 7 meses armazenada no laboratório (Figura 22B), ainda foram detectadas BMs vivas e que respondiam a mudanças no campo magnético. Porém, houve uma diminuição aparente no número de BMs, além de uma redução importante na diversidade dessas células, porém os cocos continuam sendo o morfotipo mais abundante.

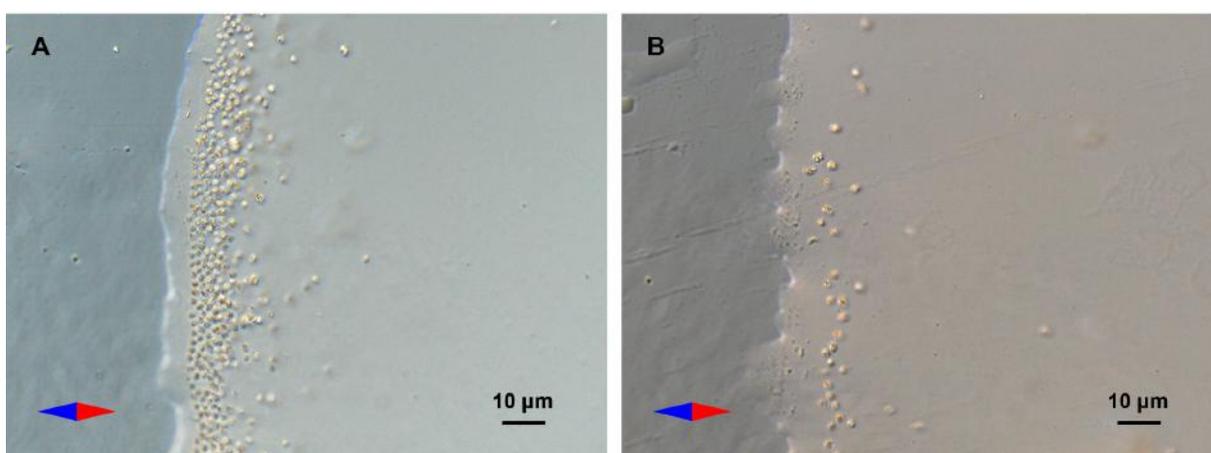


Figura 22 – Observação do comportamento magnetotático das BMs coletadas no P6 em dezembro de 2021 por microscopia óptica por DIC. As células se movimentam de forma antiparalela ao campo magnético gerado pelo ímã, se concentrando na borda da gota. A barra vermelha representa o pólo norte do ímã, enquanto a barra azul representa o polo sul. **A.** Grande diversidade de BMs no dia da amostragem. **B.** Perfil da diversidade de BMs após 7 meses da coleta, indicando resiliência de alguns grupos.

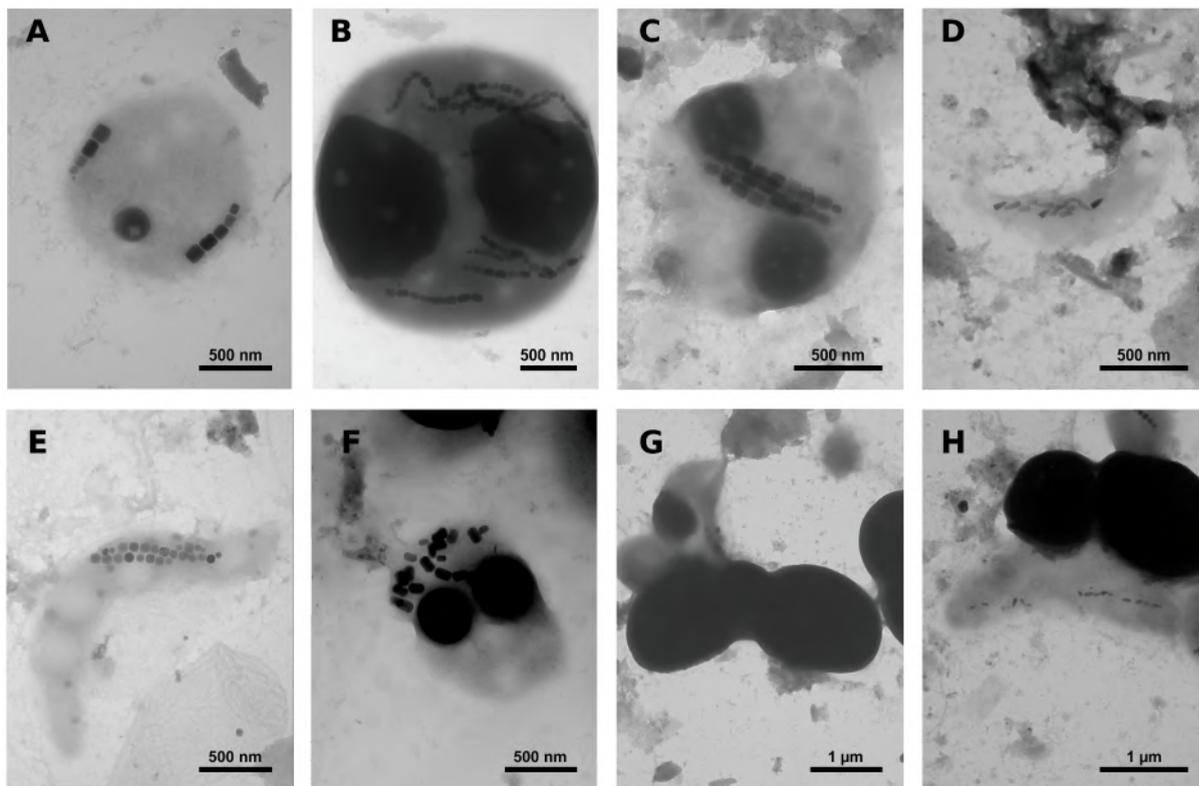


Figura 23 – Diferentes morfologias de BMs e de magnetossomos encontradas na realização de MET a partir da amostra ambiental do P6 em dezembro de 2021. Foram observados cocos (A, B, C, F), espirilos (E), vibriões, (D) e bastonetes (G, H) com diferentes morfologias, números e arranjos de magnetossomos.

Depois de um ano da primeira coleta, já em dezembro de 2022, foi realizada uma nova amostragem no ponto de amostragem P6. Novamente, uma grande diversidade de BMs foi observada na amostra bruta após a primeira concentração, apesar de a população dessas bactérias aparentar ser diferente em relação à primeira amostragem. Os morfotipos observados foram cocos, bastonetes e vibriões (Figura 24). Na observação da amostragem do P6 de dezembro de 2022 com MET, também foi possível observar a diversidade de BMs no ambiente (Figura 25). Além disso, vê-se, também, que algumas BMs encontradas possuem morfologia da célula e dos cristais diferentes dos presentes na primeira amostragem.

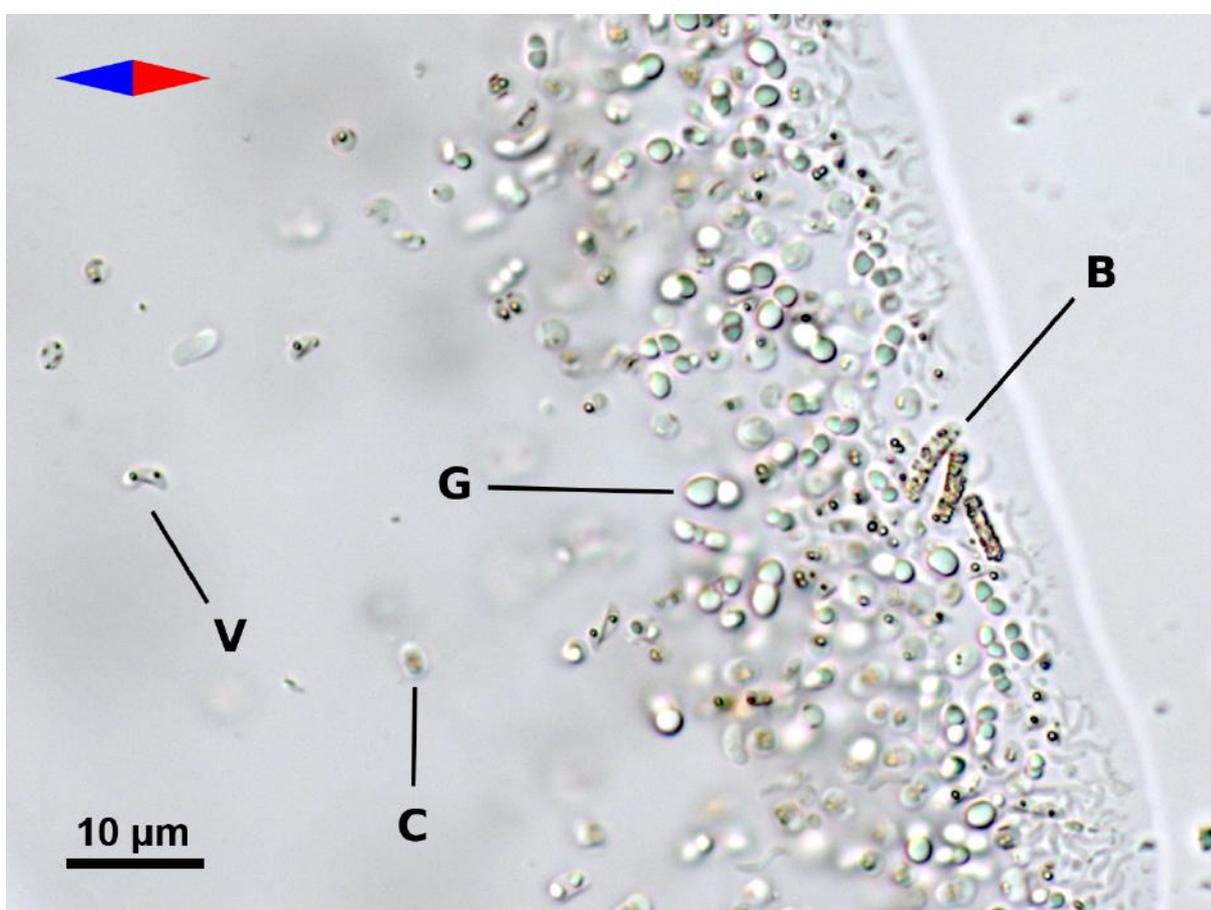


Figura 24 – Células magnetotáticas na amostra coletada no P6 em dezembro de 2022. Vê-se uma grande diversidade morfológica de BMs, como bacilos (B), cocos (C), vibriões (V) e o morfotipo com grânulos relativamente grandes (G).

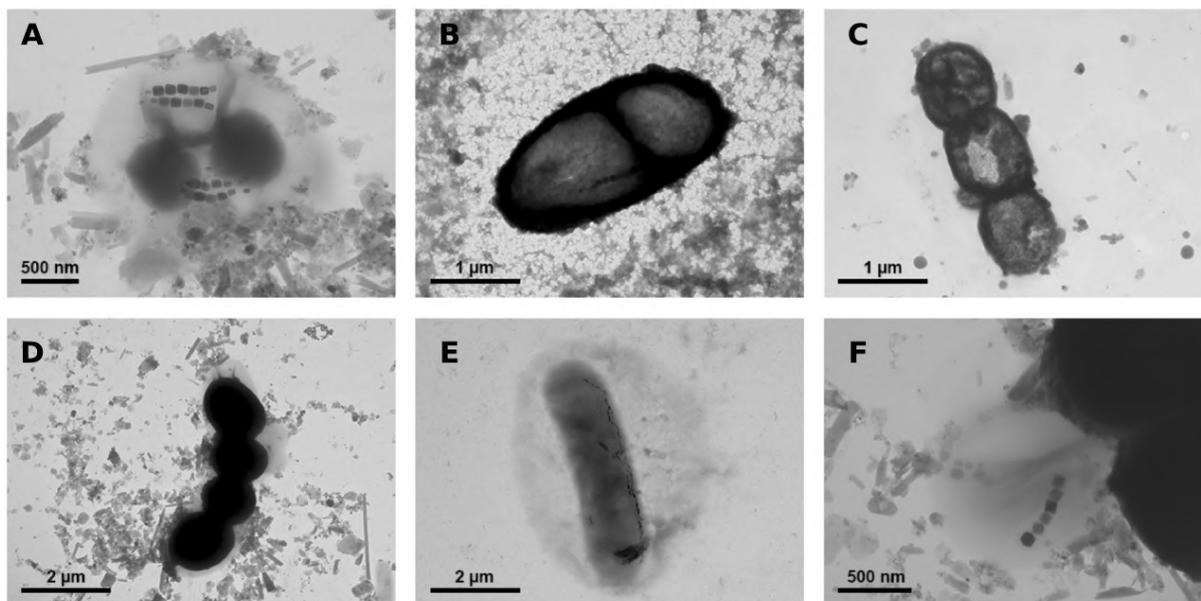


Figura 25 – MET das diferentes BMs encontradas na amostra coletada no P6 em dezembro de 2022. Foram observados cocos (**A**, **F**), bacilos (**B**, **C**, **D**, **E**) e outras morfologias não mostradas na imagem, como espirilos e vibriões. É possível ver diferentes arranjos de magnetossomos, como dois pares de cadeias em (**A**), uma cadeia em (**F**), além de diferentes morfologias, observando os cristais em (**A**) – cuboetaédricos –, (**E**) – anisotrópicos – e (**F**) – octaédricos.

Já em 2023, nas duas coletas realizadas, tanto em fevereiro quanto em maio, foi observada a prevalência do mesmo morfotipo do Rio das Almas (Figura 26), e não foi mais encontrada a mesma diversidade mostrada acima.



Figura 26 – Microscopia óptica por DIC da gota pendente feita a partir da amostra ambiental do P4, no Rio Trapicheiros, de fevereiro de 2023.

5.4 Cultivo

Ao inocular as amostras de dezembro de 2021 nos diferentes meios de cultura testados, mesmo após passar por uma etapa de concentração magnética das células desejadas, na maior parte dos meios, apenas foi observado o crescimento de organismos não magnetotáticos (Figura 27).

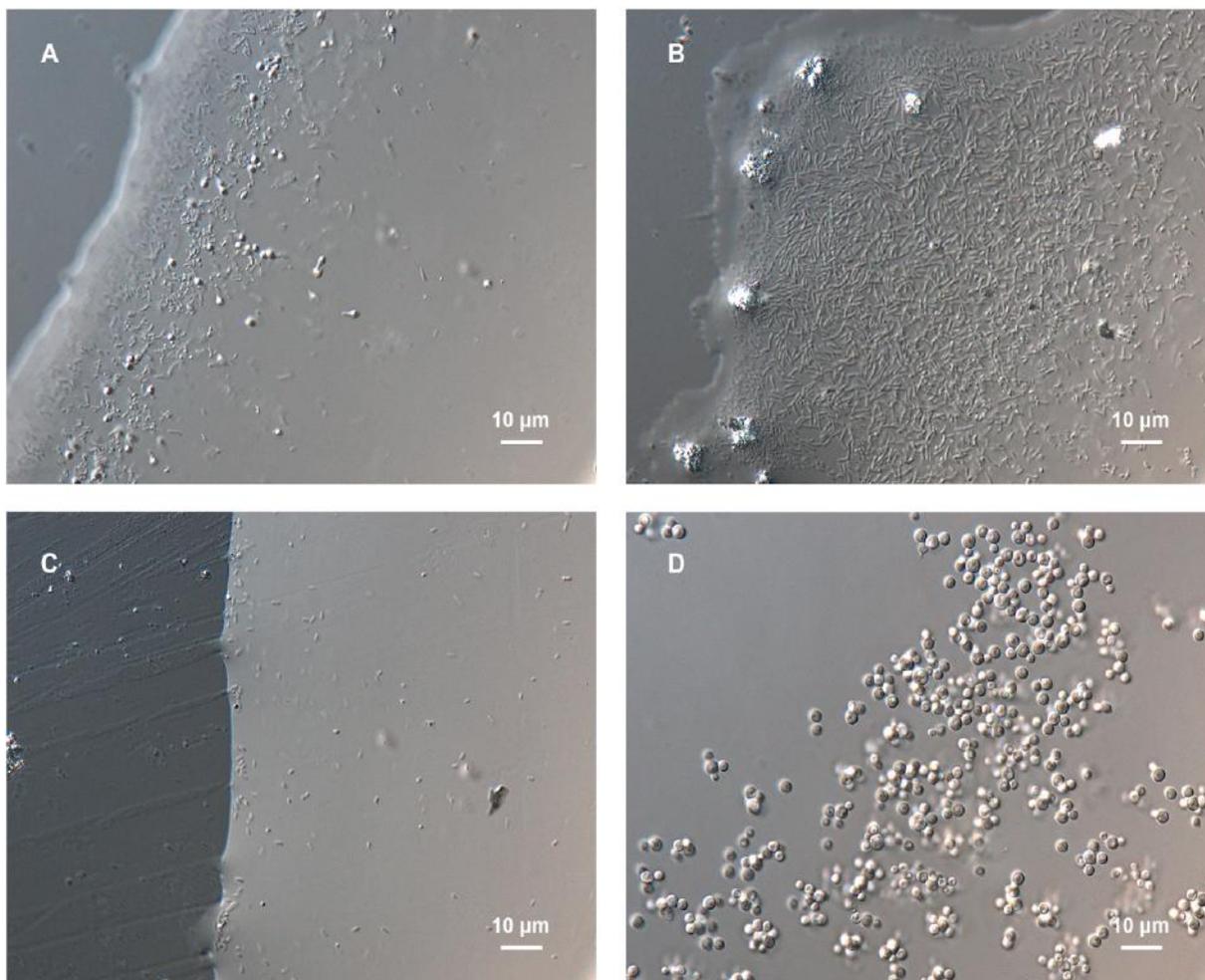


Figura 27 – Células não magnetotáticas nos meios de cultura heterotróficos com inóculo de BMs do P6 de dezembro de 2021. **A.** Células com prolongamentos e bacilos. **B.** Bacilos. **C.** Cocobacilos. **D.** Células com formato cocoide.

Foram observados, por MET, espirilos com a presença de cristais parecidos com os cristais magnéticos de BMs em uma amostra da faixa de crescimento de um meio de cultura heterotrófico usando nitrato na forma de NaNO_3 como fonte de nitrogênio, inoculado com uma alíquota do ponto P4 de maio de 2023 (Figura 28).

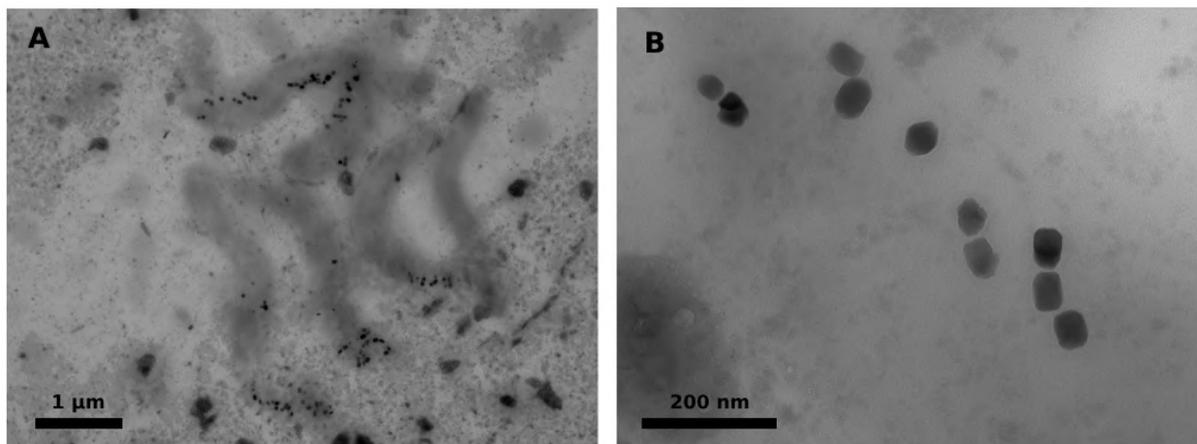


Figura 28 – MET de amostras das faixas de crescimento a partir do meio de cultura onde foram observados espirilos possivelmente magnetotáticos. **A.** Espirilos contendo cristais possivelmente magnéticos. **B.** Detalhe dos magnetossomos dos espirilos em (A).

Os espirilos observados possuem cristais de morfologia aparentemente cubo-octaédrica, sem organização de cadeia específica e com simetria variada, diferentemente das BMs observadas diretamente a partir das amostras ambientais (Figuras 23 e 25). No entanto, após repicar essas bactérias para um novo meio de cultivo com a mesma composição, apenas organismos aparentemente não magnetotáticos foram encontrados na faixa de crescimento (Figura 29).

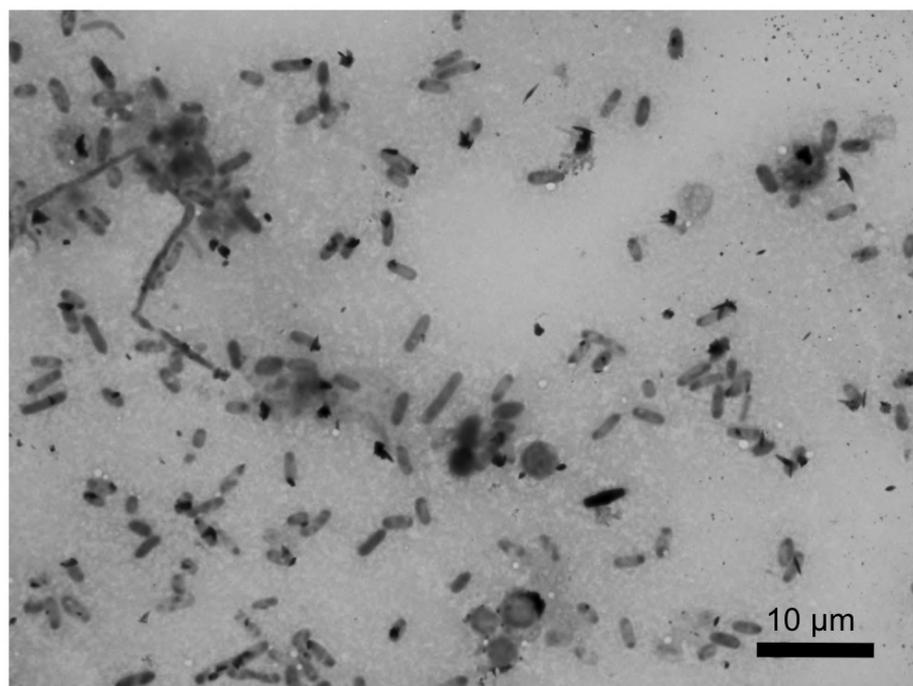


Figura 29 – MET dos bacilos sem cristais no meio utilizado para repique dos espirilos.

6 DISCUSSÃO

6.1 O ambiente e seus fatores abióticos

Diversas semelhanças foram observadas entre os valores obtidos para os parâmetros abióticos, tanto para os pontos de cada rio quanto entre os dois rios. A constância nos valores em diferentes pontos de um mesmo rio pode ser explicada pela baixa influência antrópica e proximidade dos pontos ao longo do curso d'água. Já a semelhança entre os dois rios estudados pode ser explicada por fazerem parte da mesma floresta, no mesmo bioma, em regiões geograficamente próximas (Veloso *et al.*, 1992). Dessa forma, os fatores ambientais não diferem tanto, o que permite que os parâmetros medidos estejam dentro de um mesmo intervalo pequeno.

No entanto, um dos pontos do Rio Trapicheiros, o P6, teve algumas diferenças significativas. Esse ponto faz parte de uma área de visitação que não é controlada, ao contrário do Rio das Almas e dos outros pontos do Trapicheiros, que possuem um controle na entrada de visitantes. Ainda, a presença de construções, como casas e uma barragem, próxima ao ponto de amostragem P6 pode ter influência nos parâmetros ali medidos.

Existem poucos trabalhos que tratam da biogeografia de BMs (Lin *et al.*, 2014), correlacionando fatores abióticos com a presença ou ausência de determinados morfotipos magnetotáticos. De fato, os únicos fatores que foram diretamente relacionados à presença e ausência de espécies de BMs e características de seus magnetossomos foram a salinidade do ambiente e a intensidade do campo magnético local (Lin *et al.*, 2013). No entanto, ambientes de água doce ainda não foram detalhadamente descritos quanto aos fatores abióticos e sua correlação com morfotipos de BMs e seus magnetossomos, sendo este estudo pioneiro nesse sentido.

6.1.1 Clima e chuvas

Um padrão observado na figura 17 foi que as coletas foram realizadas dias após um pico de chuva depois de um período sem chuvas. Porém, apesar de níveis diferentes na precipitação em cada dia de amostragem e das diferentes estações do ano em que as coletas foram feitas, as temperaturas do ar e água se mantiveram parecidas em cada ponto medido entre os dois rios, indicando que não houve uma influência dos fatores meteorológicos nos físico-químicos ou na diversidade de BMs.

6.1.2 Fatores físico-químicos na água

Os diferentes pontos de amostragem, tanto no Rio das Almas quanto no Rio Trapicheiros, apresentaram valores semelhantes para os fatores físicos e químicos, o que pode indicar um ambiente cujos fatores abióticos são estáveis ao longo de sua geografia. Isso resulta em uma alta probabilidade de encontrar as mesmas populações de BMs nos diferentes pontos dos rios (Lin *et al.*, 2014).

No entanto, no Rio Trapicheiros, houve uma grande variação da concentração de nitrato e silicatos dos pontos P4 e P5 para o P6. Como mencionado, o ponto P6 recebe visitantes de forma não controlada, muitas vezes entrando no rio, levando alimentos e se banhando, às vezes junto a seus cachorros. Com isso, espera-se que a concentração de nutrientes relacionados à degradação de matéria orgânica e à excreção animal, como o nitrogênio, estejam em abundância, o que explica a diferença para os outros pontos do mesmo rio e do Rio das Almas. Ainda, a presença de construções, como casas, próximas ao P6, pode explicar o aumento de nitrato, já que é possível que ocorra o despejamento de resíduos, como esgoto, nas águas do rio (Sadayappan *et al.*, 2022).

Na semana em que foram realizadas as amostragens, ocorreu um desabamento de terra próximo ao P6 por conta das chuvas recentes. Parte dos minerais desabou até a água do rio, o que pode explicar o aumento de silicatos. Novas medidas precisam ser feitas para determinar se a concentração dessas substâncias foi afetada pelo desabamento ou se é um fator natural da área.

6.3 Caracterização dos magnetossomos e grânulos

Os magnetossomos caracterizados a partir das amostras do Rio das Almas apresentaram uma alta simetria e poucos defeitos (Figura 19), sustentando a hipótese de que a biomineralização, altamente regulada geneticamente, gera cristais ditos de maior qualidade se comparada à mineralização abiótica. No entanto, outras análises precisam ser feitas para determinar a composição dos minerais e grânulos, além de confirmar as morfologias.

Ainda, a distribuição dos pontos na figura 21 aparenta indicar que os cristais dos magnetossomos analisados possuem um monodomínio magnético, sustentando o modelo teórico de Butler e Banerjee (1975) para a predição desse comportamento em cristais de magnetita biogênicos (Figura 30).

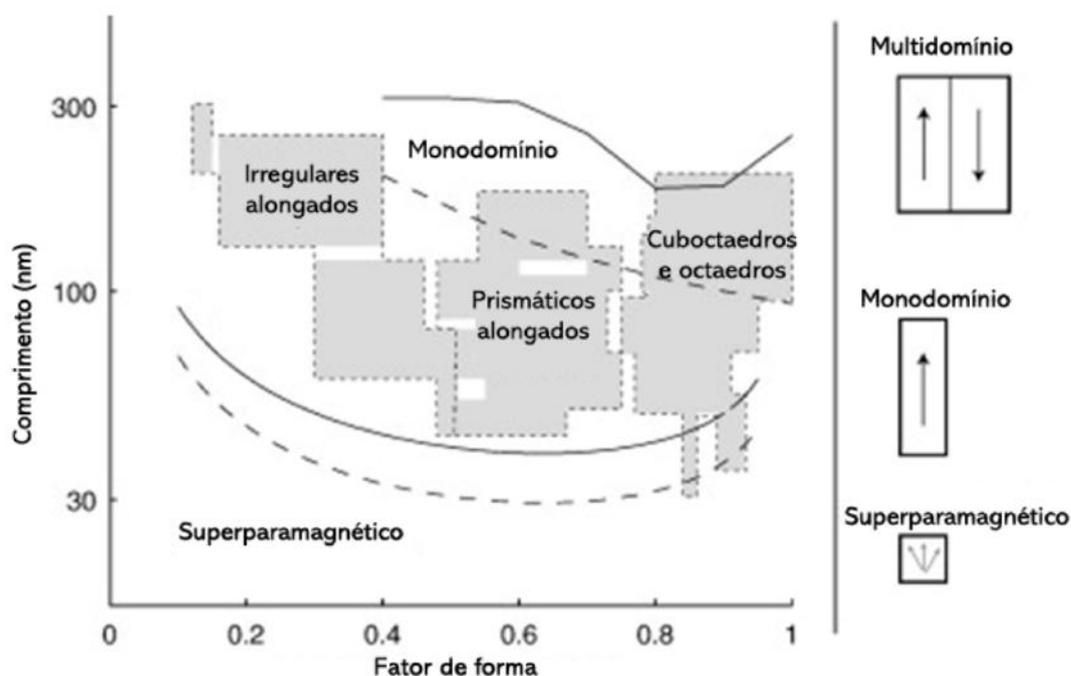


Figura 30 – Diagrama de fase magnética para magnetita biogênica de magnetossomos. Os diagramas à direita representam esquematicamente o arranjo dos momentos magnéticos de partículas com dois domínios, um domínio ou superparamagnéticas. Regiões cinzas representam o comprimento e fator de forma de magnetossomos de BMs. Figura adaptada de Kopp e Kirschvink (2008).

Segundo Abraçado *et al.* (2010), os cristais biomineralizados pelas BMs com morfologias definidas, como a cuboctaédrica observada nas análises, enquanto estão amadurecendo, quando têm um tamanho menor, não apresentam uma simetria grande, possuindo um fator de forma menor, que chega mais próximo a 1 após atingir o tamanho maduro, quando o cristal é mais simétrico. Esse fenômeno condiz com os resultados observados na figura 21, que mostra fatores de forma próximos a 1 em magnetossomos maiores.

Além disso, foi observada uma curva de distribuição com pico de quantidade em cristais de maior tamanho (Figura 20), o que indica que foram encontrados mais cristais maduros do que em cristalização.

6.2 Diversidade de BMs

Como dito anteriormente, as características dos cristais, magnetossomos e de seu arranjo nas células são geneticamente controladas e relacionadas às espécies. Por isso, a observação de diferentes BMs, com várias morfologias da célula e de seus cristais, além de diversos arranjos das cadeias de magnetossomos, mostra que há uma diversidade de espécies de BMs no PNT, principalmente no Rio Trapicheiros, onde foi encontrada a maior variação.

A maior diversidade morfológica encontrada, no entanto, ocorreu nas coletas realizadas no verão em dezembro de 2021 e de 2022, tendo a prevalência de um morfotipo de BMs nas amostragens de 2023. Como não houve diferença significativa nas condições meteorológicas entre essas épocas, é possível que exista uma variação sazonal na comunidade de BMs no PNT (Lin *et al.*, 2010).

6.2.1 Rio das Almas

No Rio das Almas, como mostra a figura 20, a maior parte dos magnetossomos medidos possui um tamanho maduro, enquanto poucos estão no início da mineralização. Com isso, pode-se deduzir que a multiplicação das BMs nos riachos não ocorre em uma taxa alta, sugerindo um equilíbrio da população condizente com o equilíbrio dos parâmetros abióticos.

No entanto, os cristais analisados vêm de um mesmo morfotipo de BMs, que foi prevalente nesse rio. Isso pode sugerir que essas bactérias encontradas estão mais adaptadas às condições abióticas encontradas no ambiente estudado durante a época da análise (Lin *et al.*, 2010), favorecendo o crescimento de sua população, fazendo com que tenha o maior número de indivíduos dentro da comunidade de BMs do PNT. É possível que em outras épocas do ano os parâmetros ambientais mudem, gerando uma mudança nessa diversidade.

6.2.2 Rio Trapicheiros

A maior diversidade de BMs foi observada no P6, no Rio Trapicheiros, onde também foram medidas as maiores concentrações de nitrato. É conhecido que as concentrações de nitrato podem influenciar na diversidade de BMs em ambientes de água doce (Lin e Pan, 2010), assim como, em ambientes salgados, a salinidade desempenha um papel similar (Lin *et al.*, 2012). Com isso, a diferença nas concentrações de nitrato obtidas nas análises, em

conjunto com a maior diversidade encontrada nesse ponto, sustentam a hipótese de que o nitrato é um íon importante para definir a comunidade de BMs no ambiente.

Além disso, no P6, ao longo do tempo, foram vistos arranjos diferentes de cadeias de magnetossomos, o que sustenta a mudança da população de BMs na segunda amostragem. As estações do ano em que foram feitas as amostragens, assim como os níveis de precipitação, não tiveram efeito na diversidade. Essas diferenças na comunidade de BMs observadas entre as amostras do ponto P6 em dois períodos distintos, então, mostram certo dinamismo na composição das populações de BMs, o que pode indicar um nível elevado de competição nos rios (Pernthaler, 2013).

Ainda, o valor da APT no P6 é aproximadamente duas e três vezes maior, respectivamente, quando comparado com os pontos P4 e P5. Isso pode ser explicado por se tratar de um ponto mais eutrofizado, com a presença de construções e visitantes.

De modo geral, em ambos os rios, mais coletas e análises são necessárias para entender o dinamismo na biodiversidade ao longo do tempo e observar possíveis padrões nas diferentes estações do ano, além de determinar se os fatores físico-químicos analisados sofrem mudanças sazonais e se são determinantes na diversidade de BMs no ecossistema do PNT.

6.4 Crescimento em meio de cultura

O crescimento de bactérias não magnetotáticas favorecido no lugar das BMs pode ser explicado pelo RT não ser totalmente capaz de filtrar os microrganismos não magnetotáticos, além de as BMs serem extremamente fastidiosas, muito dependentes de gradientes químicos (Lefèvre e Bazylinski, 2013), e de no local de amostragem existirem outros organismos mais resistentes e menos exigentes.

Apesar de ter sido observado o crescimento, em um dos meios de cultura com nitrato, de espirilos possivelmente magnetotáticos, suas cadeias de cristais eram desorganizadas, o que sugere que as bactérias observadas cresceram no meio de cultura, em vez de apenas terem sido inoculadas do ambiente, já que na visualização direta das amostras ambientais, os magnetossomos têm um arranjo específico. Isso pode estar relacionado à falta, no meio de cultivo utilizado, de alguns fatores químicos, físicos e biológicos normalmente presentes no ambiente (Morillo, 2014). Ainda, pode ter ocorrido uma mutação no cluster de genes do magnetossomo (Murat *et al.*, 2010), gerando esse padrão desorganizado, que não é

característico de espirilos magnetotáticos, mas comumente observado em cocos, mostrado na figura 23F e em Abreu *et al.* (2016).

Outro aspecto visto é que os espirilos eram pouco abundantes na amostra ambiental, mas foram o único morfotipo selecionado pelo meio de cultura. Há relatos na literatura de que membros da biosfera rara de ambientes são capturados por métodos dependentes de cultivo, podendo até não estarem presentes em resultados de métodos independentes de cultivo (Shade *et al.*, 2012), o que pode gerar uma certa tendência em estudos da comunidade microbiana baseada nesses tipos de métodos. Dessa forma, infere-se que, para obter a maior veracidade e riqueza em relação à diversidade de BMs no ambiente, o ideal é realizar análises independentes de cultivo em conjunto com tentativas de cultura (Shade *et al.*, 2012).

Assim, mais tentativas de cultivo devem ser feitas, utilizando diferentes parâmetros para composição do meio de cultura, além de novos protocolos de isolamento com RT ou outras técnicas, a fim de minimizar as diferenças para o ambiente e favorecer mais o crescimento de BMs. Com isso, espera-se otimizar cada vez mais o crescimento dessas bactérias em laboratório e facilitar seu uso em ferramentas biotecnológicas.

7 CONCLUSÕES

Foram realizadas coletas de água e sedimento em dois riachos do PNT, Rio das Almas e Rio Trapicheiros, para a caracterização dos fatores abióticos e das BMs presentes. Os fatores abióticos dos rios, incluindo pH, temperatura e concentração de nutrientes, mantiveram-se relativamente constantes ao longo dos pontos de coleta, indicando um ambiente estável com pouca influência antrópica, exceto em áreas específicas como o ponto P6 do Rio Trapicheiros, que apresentou variações significativas provavelmente devido à visitação descontrolada e proximidade de construções.

A diversidade de BMs nos rios do PNT foi grande, com diferentes morfotipos presentes em algumas amostras de sedimento. O morfotipo de BMs analisado apresentou cristais de magnetossomos com alta simetria e poucos defeitos, corroborando a hipótese de que a biomineralização é um processo altamente regulado geneticamente, resultando em cristais de alta qualidade, que podem ser extraídos e utilizados na biotecnologia.

Apesar das tentativas de cultivo de BMs a partir das amostras ambientais, apenas espirilos provavelmente magnetotáticos foram observados em um meio de cultura, sem sucesso na replicação. Isto reforça a necessidade de desenvolvimento de meios de cultivo mais específicos e a continuidade dos estudos para a bioprospecção de BMs.

No geral, este estudo fornece uma base para futuras pesquisas na bioprospecção de BMs na Mata Atlântica, tendo sido pioneiro no conhecimento sobre BMs no PNT e na relação de alguns fatores abióticos com a diversidade morfológica de BMs, destacando a importância de explorar novos ambientes para aumentar a probabilidade de encontrar cepas cultiváveis e com potencial biotecnológico. A compreensão detalhada da ecologia das BMs no PNT pode contribuir para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras em diversas áreas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraçado, L. G.; Abreu, F. A.; Keim C. N.; Campos A. P. C.; Lins, U.; Farina, M. (2010). Magnetosome chain superstructure in uncultured magnetotactic bacteria. *Phys. Biol.* 7, 046016.
- Abreu, F.; Martins, J.L.; Silveira, T.S.; Keim, C.N.; Lins De Barros, H.G.; Gueiros-Filho F. e Lins, U. (2007). ‘Candidatus Magnetoglobus multicellularis’ a multicellular magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 57, 1318-1322.
- Abreu, F (2010). Bactérias magnetotáticas de ambientes extremos. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia). Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 101f.
- Abreu, F., Carolina, A., Araujo, V., Leão, P., Silva, K. T., Carvalho, F. M. e Lins, U. (2016). Culture-independent characterization of novel psychrophilic magnetotactic cocci from Antarctic marine sediments. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4426–4441.
- Abreu, F. A.; Morillo, V.; Trubitsyn, D. e Bazylinski, D. A. (2020). Magnetotaxis in Prokaryotes. eLS.
- Araujo, A. C. V.; Abreu, F. A.; Silva, K. T.; Bazylinski, D. A. e Lins, U. (2015). Magnetotactic Bacteria as Potential Sources of Bioproducts. *Marine Drugs*. 13, 389-430.
- Balkwill, D. L.; Maratea, D. e Blakemore, R. P. (1980). Ultrastructure of a magnetotactic spirillum. *Journal of Bacteriology*, v. 141, n. 3, p.1399–1408.
- Bazylinski, D.A.; Frankel, R.B.; Heywood, B.R.; Mann, S.; King, J.W.; Donaghay, L. e Hanson, A.K. (1995). Controlled biomineralization of magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) in a magnetotactic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3232-3239.
- Bazylinski, D. A. e Frankel, R. B. (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 217–230.
- Bazylinski, D. A. (2013). *Magnetovibrio blakemorei* gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium (Alphaproteobacteria: Rhodospirillaceae) isolated from a salt marsh. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, n. PART 5, p. 1824–1833.
- 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. (2013). *Magnetococcus marinus* gen. nov.; sp. nov.; a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (Magnetococcaceae fam. nov.; Magnetococcales ord. nov.) at the base of the Alphaproteobacteria. *Int. J. Sys. Evol. Microl.* 63, 801-808.
- Blakemore, R.P (1975). Magnetotactic bacteria. *Science*. 190, 377-379.
- Blakemore, R.P (1982). Magnetotactic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 36, 217-238.
- Blundell, S. (2001). *Magnetism in Condensed Matter*. Oxford University Press.
- Brasil (2000). Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1o, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências.
- Cabral, A. S.; Verdan, M.; Presciliano, R.; Silveira, F.; Correa, T. e Abreu, F. A. (2023). Large-scale cultivation of magnetotactic bacteria and the optimism for sustainable and cheap approaches in nanotechnology. *Mar. Drugs*. 21, 60.
- Chikazumi, S. (1997). *Physics of Ferromagnetism*. Oxford University Press.
- Correa, T.; Presciliano, R.; Abreu, F. (2021). Why Does Not Nanotechnology Go Green? Bioprocess Simulation and Economics for Bacterial-Origin Magnetite Nanoparticles. *Front. Microbiol.* 12, 718232.
- Cullity, B. D. e Graham, C. D. (2011). *Introduction to Magnetic Materials*. John Wiley & Sons.
- Cypriano, J. B. S. (2019). Magnetossomos, potenciais nanoferramentas em Biotecnologia: avaliação da biocompatibilidade e estabilidade térmica. Tese (Doutorado em Ciências – Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Du, H. (2019). Magnetosome Gene Duplication as an Important Driver in the Evolution of Magnetotaxis in the Alphaproteobacteria. *mSystems*. v. 4, n. 5, p. 1–10.

- Dziuba, M. (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*, v. 66, n. 5, p. 2069–2077.
- Frankel, R.B.; Bazylinski, D.A.; Johnson, M.S. e Taylor, B.L. (1997). Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys. J.* 73, 994-1000.
- Gasol, J. M. e del Giorgio, P. A. (2000) Using Flow Cytometry for Counting Natural Planktonic Bacteria and Understanding the Structure of Planktonic Bacterial Communities. *Scientia Marina*, 64, 197-224.
- Grasshoff, K.; M. Erhardt e K. Kremling. (1999) *Methods of Seawater Analysis*. Verlag-Chemie, Weinheim, p. 600.
- Grouzdev, D. S. (2014). Draft genome sequence of *Magnetospirillum* sp. strain SO-1, a freshwater magnetotactic bacterium isolated from the Ol'khovka River, Russia. *Genome Announcements*, v. 2, n. 2, p. 2164.
- Heyen, U. e Schüler, D. (2003). Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 536-544.
- Ji, B. (2014). Comparative genomic analysis provides insights into the evolution and niche adaptation of marine *Magnetospira* sp. QH-2 strain. *Environmental Microbiology*, v. 16, n. 2, p. 525–544.
- Ke, L.; Liu, P.; Gao, M. (2017). Complete Genome Sequence of the *Magnetospirillum* sp. ME-1, a Novel Magnetotactic Bacterium Isolated from East Lake, Wuhan, China. v. 5, n. 34, p. 4–5.
- Kovaliova, A. (2017). Genome sequence of the acid-tolerant *Desulfovibrio* sp. DV isolated from the sediments of a Pb-Zn mine tailings dam in the Chita region, Russia. *Genomics Data*, v. 11, p. 125–127.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing, p 115–175. In Stackebrandt E, GoodfellowM(ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley& Sons, Chichester, United Kingdom.
- Langel, R. A. (1987). The Main Field. In *Geomagnetism*. v. 1, pp. 249-512.
- Lefèvre, C. T. (2009). Isolation and characterization of a magnetotactic bacterial culture from the Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 7, p. 1646–1657.
- Lefèvre, C. T.; Abreu, F. A.; Schmidt, M. L.; Lins, U.; Frankel, R. B.; Hedlund, B. P. e Bazylinski, D. A. (2010). Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3740-3743.
- Lefèvre, C. T. (2011). A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria. *Science*, v. 334, n. 6063, p. 1720–1723.
- Lefèvre, C. T. (2012). Novel magnetite-producing magnetotactic bacteria belonging to the Gammaproteobacteria. *ISME Journal*, v. 6, n. 2, p. 440–450.
- Lefèvre, C. T e Bazylinski, D. A. (2013). Ecology, Diversity, and Evolution of Magnetotactic Bacteria. *MMBR*, v. 77, n. 3, p. 497–526.
- Lin, W. e Pan, Y. (2010). Temporal variation of magnetotactic bacterial communities in two freshwater sediment microcosms. *FEMS Microbiol. Lett.* 302, 85–92.
- Lin, W., Wang, Y., Li, B. e Pan, Y. (2012). A biogeographic distribution of magnetotactic bacteria influenced by salinity. *ISME J.* 6, 475–479.
- Lin, W.; Wang, Y.; Gorby, Y.; Nealson, K. e Pan, Y. (2013). Integrating niche-based process and spatial process in biogeography of magnetotactic bacteria. *Sci. Rep.* 3, 1643.
- Lin, W.; Bazylinski, D. A.; Xiao, T.; Wu, L. e Pan, Y. (2014). Life with compass: diversity and biogeography of magnetotactic bacteria. *Environmental Microbiology*. 16(9), 2646-2658.
- Lin, W.; Zhang, W.; Zhao, X.; Roberts, A. P.; Paterson, G. A.; Bazylinski, D. A. e Pan, Y. (2018). Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. *ISME Journal*. 12, 1508–1519.
- Mann, S.; Moench, T. T. e Williams, R. J. P. (1984). A high resolution electron microscopic investigation of bacterial magnetite. Implications for crystal growth. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 221, 385-393.

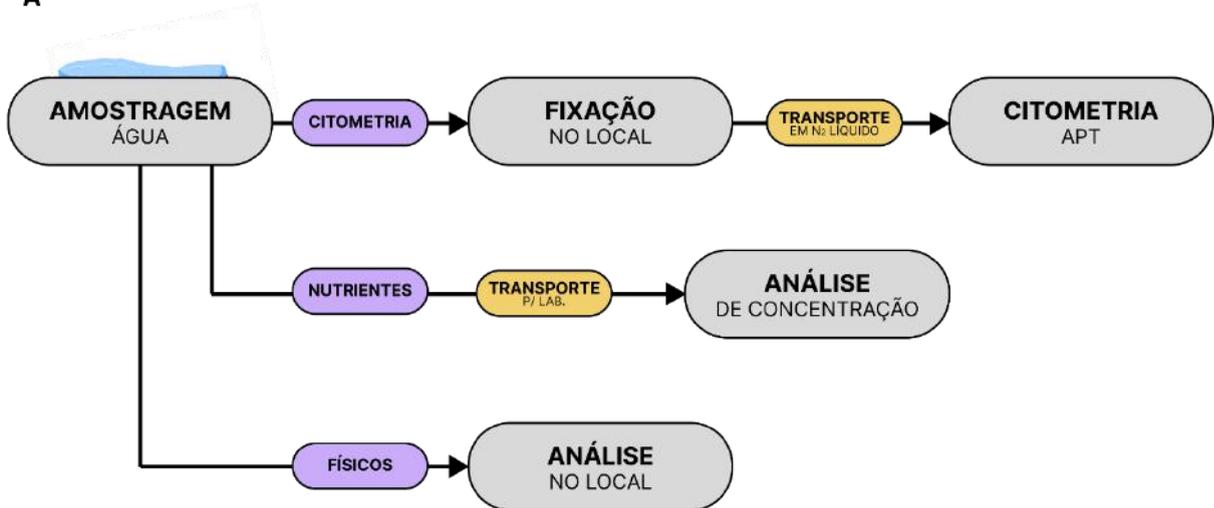
- Marques, H.; Monico, G.; Aquino, M. e Rosa, G. (2009). Efeitos de segunda e terceira ordem da ionosfera no posicionamento GNSS no Brasil. *Revista Brasileira de Geofísica*. 27.
- Merrill, R. T., McElhinny, M. W. e McFadden, P. L. (1996). *The Magnetic Field of the Earth: Paleomagnetism, the Core, and the Deep Mantle*. Academic Press.
- Minas K.; McEwan N. R.; Newbold C. J.; Scott K. P. (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiol Lett.* 325(2), 162-9.
- Moench, T. T. e Konetzka, W. A. (1978). A novel method for the isolation and study of a magnetotactic bacterium. *Arch. Microbiol.* 119, 203-212.
- Monteil, C. L. (2018). Genomic study of a novel magnetotactic Alphaproteobacteria uncovers the multiple ancestry of magnetotaxis. *Environmental Microbiology*, v. 20, n. 12, p. 4415–4430.
- 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) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Murat, D.; Quinlan, A.; Vali, H. e Komeili, A. (2010). Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107, 5593-5598.
- Nakazawa, H. (2009). Whole genome sequence of *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 revealed common gene clusters in magnetotactic bacteria. *Genome Research*, v. 19, n. 10, p. 1801–1808.
- Okamura, Y. (2003). Design and application of a new cryptic-plasmid-based shuttle vector for *Magnetospirillum magneticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 7, p. 4274–4277.
- Parque Nacional da Tijuca (2020). Relevo e Hidrografia. 2020. Disponível em: <<https://parquenacionaldatijuca.rio/relevo-e-hidrografia/>>. Acesso em 29 de novembro de 2023.
- Parsons, T. R.; Maita Y. e Lalli C. M. (1984). *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, Oxford, p.173.
- Pernthaler, J. (2013). *Freshwater Microbial Communities. The Prokaryotes*, 97–112.
- Pettermann, H. e Bleil, U. (1993). Detection of live magnetotactic bacteria in South Atlantic deepsea sediments. *Earth Planet. Sci. Lett.* 117, 223-228.
- Pierangeli G. M. F.; Domingues M. R.; Jesus T. A.; Coelho L. H. G.; Hanisch W. S.; Pompêo M. L. M.; Saia F. T.; Gregoracci G. B. e Benassi R. F. (2021). Higher Abundance of Sediment Methanogens and Methanotrophs Do Not Predict the Atmospheric Methane and Carbon Dioxide Flows in Eutrophic Tropical Freshwater Reservoirs. *Front. Microbiol.* 12, 647921
- Por, F. D. (1992) *Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil*. The Hague: SPB Academic Pub.
- Rezende, C. L.; Scarano, F. R.; Assad, E. D.; Joly, C. A.; Metzger, J. P.; Strassburg, B. B. N.; Tabarelli, M.; Fonseca, G. A. e Mittermeier, R. A. (2018). From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation*. 16(4), 208–214.
- Sadayappan, K.; Kerins, D.; Shen, C.; Li, Li. (2022). Nitrate concentrations predominantly driven by human, climate, and soil properties in US rivers. *Water Research*. 226.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. e Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 9(7), 671–675.
- Schübbe, S. (2009). Complete genome sequence of the chemolithoautotrophic marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 14, p. 4835–4852.
- Schüler, D. (1999). Formation of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(1), 79-86.
- Shade, A.; Hogan, C. S.; Klimowicz, A. K.; Linske, M.; McManus, P. S. e Handelsman, J. (2012). Culturing captures members of the soil rare biosphere. *Environmental Microbiology*. 14(9), 2247-2252.

- Spring, S.; Lins, U.; Amann, R.; Schleifer, K. H.; Ferreira, L. C.; Esquivel, D. M. e Farina, M. (1998). Phylogenetic affiliation and ultrastructure of uncultured magnetic bacteria with unusually large magnetosomes. *Arch. Microbiol.* 169, 136-147.
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis* (Vol. 167, pp. 71-75). Fisheries Research Board of Canada.
- Taveira, I. N. (2020). *Diversidade de bactérias magnetotáticas e magnetossomos na planície de inundação do Rio Araguaia*. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Vargas, G.; Cypriano, J.; Correa, T.; Leão, P.; Bazylnski, D. A.; Abreu, F. A. (2018). Applications of Magnetotactic Bacteria, Magnetosomes and Magnetosome Crystals in Biotechnology and Nanotechnology. *MiniReview. Molecules.* 23, 2438.
- Veloso, H. P. L. C.; Oliveira-Filho, A. M. S. F.; Vaz, M. P. M.; Lima, R.; Marquete J. E. M. e Brazão. (1992). *Manual técnico da vegetação brasileira*. 1a. ed. Rio de Janeiro: IBGE. 92 p. *Manuais técnicos em geociências*, n. 1. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=223267>>
- Wan, J.; Browne, P. J.; Hershey, D. M.; Montabana, E.; Iavarone, A. T.; Downing, K. H. e Komeili, A. (2022). A protease-mediated switch regulates the growth of magnetosome organelles in *Magnetospirillum magneticum*. *PNAS*.
- Wang, Y. (2016). Complete Genome Sequence of *Magnetospirillum* sp. Strain XM-1, Isolated from the Xi'an City Moat, China. v. 4, n. 5, p. 4–5.
- Williams, T. J. (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 Evolutionary Microbiology*, v. 62, n. 10, p. 2443–2450.
- Xie, J.; Chen, K.; Chen, X. (2009). Production, modification and bio-applications of magnetic nanoparticles gestated by magnetotactic bacteria. *Nano Res.* 2, 261-278.
- Yan, L. (2014). Complete Genome Sequence of *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Genome Announcements*, v. 2, n. 2, p. 2–3.

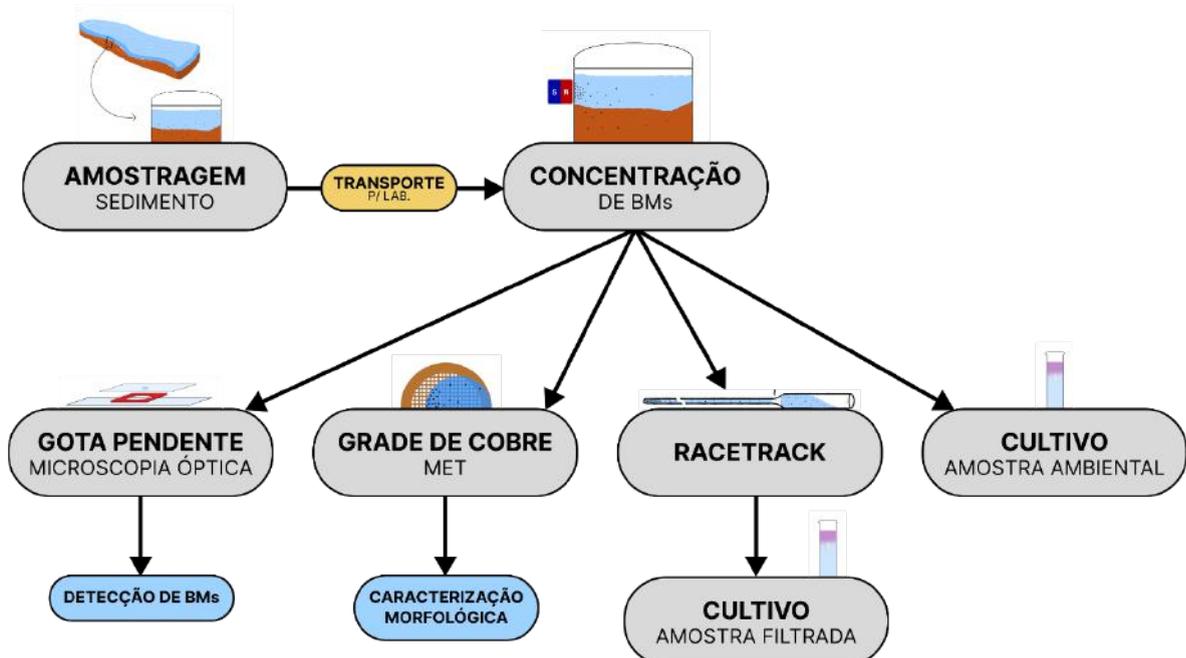
9 APÊNDICES

Apêndice A – Fluxograma de amostragens e análises. A. Fluxo da análise de água. A água foi coletada com três objetivos: citometria, análise de nutrientes e análise de fatores físicos. B. Fluxo da análise de sedimento. Após o transporte para o laboratório e a concentração magnética de BMs, diversas análises foram feitas a partir da amostra enriquecida.

A



B



Apêndice B – Quadro de composição dos meios de cultivo utilizados para 100 mL de água.

Reagente	Concentração ou Referência	Meios			
		IT-1 sem Sal	BMs de H2O doce	Cocos de H2O doce com NO3	JNFb
H2O (mL)	-	100	100	100	100
Ágar (g)	-	0,15	0,15	0,22	0,19
Acetato de Na (g)	-	0,1	0,01	-	-
Ácido Málico (g)	-	-	-	-	0,5
Bicarbonato (g)	-	-	0,1	-	-
L-Cisteína (g)	-	-	0,06	-	-
Cloreto de Amônio (g)	-	0,024	0,02	-	-
Cloreto de Sódio (g)	-	-	-	-	0,01
HEPES (g)	-	0,3	0,3	-	-
K2HPO4 (monobásico) (g)	-	-	-	-	0,06
KH2PO4 (dibásico) (g)	-	-	-	-	0,18
K2HPO4 (monobásico) (μL)	0,5 M	400	400	150	-
Minerais de Wolfé (μL)	Frankel <i>et al.</i> (1997)	500	500	500	-
MgSO4.7H2O (g)	-	-	0,01	-	0,02
NaNO3 (nitrato) (g)	-	-	-	0,02	-
Quinato Férrico (μL)	0,01 M	200	200	-	1200
Resazurina (μL)	0,20%	20	20	20	20
Succinato (g)	-	0,06	0,01	0,1	-
Sulfato Ferroso (mL)	0,01 M	-	-	4	-
Tiosulfato (μL)	40%	300	500	150	-
Tris (g)	-	-	-	0,12	-
Vitaminas (μL)	Frankel <i>et al.</i> (1997)	50	50	100	100