



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROFESSOR PAULO DE GÓES

KAREN TAVARES SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DISTRIBUIÇÃO DE MAGNETOSSOMOS EM

‘*CANDIDATUS MAGNETOGLOBUS*

MULTICELLULARIS’

RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha Catalográfica

SILVA, Karen Tavares

Título: Distribuição de magnetossomos em '*Candidatus Magnetoglobus multicellulares*'

v, 71p.

Orientador: Dr. Ulysses Garcia Casado Lins

Dissertação: Mestrado em Microbiologia e Imunologia

1. Magnetossomos
2. Bactérias Magnetotáticas
3. '*Candidatus Magnetoglobus multicellulares*'

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Distribuição de magnetossomos em '*Candidatus Magnetoglobus multicellulares*'

Trabalho realizado no laboratório de biologia e ultraestrutura de procariotos, no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Ulysses Garcia Casado Lins.

Financiamento: CAPES, CNPq e FAPERJ.

AGRADECIMENTOS

O meu trabalho não foi feito no isolamento. Em cada etapa havia várias pessoas me ajudando, me incentivando, me influenciando. Tenho que agradecer a todos que estiveram ao meu lado ao longo do mestrado.

Ao grupo do laboratório, que faz o trabalho ser um prazer. Nós somos uma família grande, com todos se preocupando e se ajudando.

À Juliana, que parece ter me adotado, sempre conversando e me dando equilíbrio.

À Thaís e Iamê, com seus comentários inteligentes e impagáveis.

À Julia, Fernanda, Herval e Carol.

Ao Fernando, meu companheiro de canto, que me ajudou nas filmagens.

À Leida, que me ajudou com muita paciência, na estatística.

Ao professor Ulysses, o mais difícil é saber o quanto exigir, e disso tirar o melhor do aluno. O melhor orientador (carrancudo!) que um aluno pode pedir.

Minha família é a base para tudo dar certo. Eles são meu coração e o meu chão. Nada poderia dar certo se eles não estivessem lá, me apoiando a cada momento. Amo vocês!

RESUMO

‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ é um microrganismo multicelular magnetotático não cultivado composto por 10 a 40 bactérias gram-negativas geneticamente idênticas que nadam como um todo, alinhado às linhas de um campo magnético aplicado, devido à presença no citoplasma de cristais magnéticos organizados em cadeias, envoltos por membrana, chamados de magnetossomos. As células desse microrganismo são arrançadas radialmente ao redor de um compartimento interno acelular de maneira que todas as células têm contato com o ambiente externo e com o compartimento interno. ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ demonstra uma resposta magnetotática otimizada e altamente eficiente que depende do movimento coordenado dos flagelos e da orientação de cada cristal no interior do microrganismo. Neste trabalho, descrevemos como os magnetossomos são organizados dentro do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’. Medidas da distribuição celular dos magnetossomos em cortes ultrafinos revelam que a maioria dos magnetossomos está localizada próxima à membrana em contato com o ambiente externo. Cada célula de ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ tem cerca de 52 magnetossomos. Esses magnetossomos têm um diâmetro médio de 83 nm e estão distribuídos em cerca de 6 cadeias por célula com 9 magnetossomos cada uma. Observamos que muitas cadeias dos magnetossomos nas células estão paralelas entre si e estão arrançadas em um ou dois grupos. Modelos tridimensionais mostram que os magnetossomos estão distribuídos uniformemente na maioria dos microrganismos. No entanto, foram observadas exceções, em que os magnetossomos estão ausentes de partes do microrganismo, sem afetar a disposição das cadeias nas outras regiões. Os magnetossomos estão presentes nos dois lados em uma célula em divisão e também em ambos os microrganismos filhos do microrganismo em divisão, confirmando que as células e microrganismo filhos recebem magnetossomos da célula e microrganismo original,

respectivamente, o que resultaria em transmissão de uma polaridade magnética de geração em geração.

ABSTRACT

'*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' is an uncultivated multicellular magnetotactic microorganism composed of 10-40 genetically identical gram negative bacteria that swim as a whole aligned in the magnetic field due to the presence in the cytoplasm of magnetic crystals arranged in chains surrounded by membrane, called magnetosomes. The bacterial cells are arranged radially around a central acellular compartment in such a way that all cells have contact with both the external environment and this internal compartment. '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' demonstrate a highly efficient and optimized magnetotactic response. The microorganism movement depends on the coordinated movement of the flagella and on the orientation of each magnetosome crystal inside the microorganism. In this work, we describe of how the magnetosomes are organized within the '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'. Measurements of the cellular distribution of the magnetosomes in ultrathin sections reveal that the majority of the magnetosomes are close to the membrane in contact to the external environment. Each cell of "*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*" has about 52 magnetosomes. These magnetosomes have a mean diameter of 83 nm and are distributed in about 6 per cell chains with 9 magnetosomes each. We noticed that many chains of magnetosomes cells are parallel to each other and are arranged in one or two groups. Models show that the three-dimensional magnetosomes are distributed evenly in most microorganisms. However, exceptions were found, in which the magnetosomes are absent from parts of the microorganism, without affecting the disposition of the chains in other regions. The magnetosomes are present in both sides of dividing cells and also in both daughter microorganisms of the microorganism in division, confirming that the cells and daughter microorganisms receive magnetosomes from the cell and microorganism original,

respectively, which result in transmission of a magnetic polarity of generation to generation.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Bactérias magnetotáticas	1
1.2. Magnetotaxia	2
1.3. Diversidade Morfológica e filogenética	5
1.4. Magnetossomos	9
1.5. Disposição celular dos magnetossomos	11
1.6. ‘<i>Candidatus Magnetoglobus multicellularis</i>’	14
1.6.1. Características	14
1.6.2. Ciclo biológico	16
1.6.3. Movimento	18
1.7. Justificativa	19
2. OBJETIVO	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. METODOLOGIA	22
3.1. Coleta de amostras	22
3.2. Isolamento magnético	22
3.3. Purificação do concentrado	23
3.4. Microscopia de luz	23
3.4.1. Campo Claro	23
3.4.2. Fluorescência	24
3.5. Microscopia eletrônica de transmissão	24
3.5.1. Células inteiras, não contrastadas	24
3.5.2. Cortes ultrafinos	24

3.5.3. Modelo tridimensional	25
3.6. Análise de dados	26
4. RESULTADOS	27
Prancha 01	35
Prancha 02	38
Prancha 03	41
Prancha 04	44
Prancha 05	47
Prancha 06	50
Prancha 07	53
5. DISCUSSÃO	56
6. BIBLIOGRAFIA	64

1.1. Bactérias magnetotáticas

O trabalho experimental em magnetotaxia bacteriana começou há mais de 30 anos atrás, quando Richard Blakemore observou que uma população de bactérias móveis de sedimentos aquáticos respondia diretamente ao campo magnético (Blakemore, 1975). Essas bactérias eram orientadas na direção do campo magnético de um ímã enquanto nadavam. A capacidade de orientação e navegação no campo magnético foi chamada magnetotaxia. A magnetotaxia ocorre devido a presença de partículas magnéticas envoltas por membrana biológica chamadas de magnetossomos, no citoplasma das bactérias magnetotáticas (Blakemore, 1975). As bactérias magnetotáticas produzem tanto magnetossomos de óxido de ferro, que contém cristais de magnetita (Fe_3O_4) ou de sulfeto de ferro, que contém cristais de greigita (Fe_3S_4). Esses cristais magnéticos pelas suas dimensões são considerados dipolos magnéticos permanentes, que levam à orientação das células ao longo das linhas do campo magnético enquanto elas migram propelidas por flagelos. Dipolo magnético é uma estrutura elementar magnética, como um ímã de bússola, com pólos magnéticos norte e sul que experimentam um torque em um campo magnético (Bazylinski & Frankel, 2004).

As bactérias magnetotáticas compreendem um grupo heterogêneo de procariotos que apresentam uma grande diversidade morfológica incluindo cocos, bacilos, vibrios, espirilos e até mesmo uma forma multicelular, como no caso do objeto do presente estudo. Todas as bactérias magnetotáticas foram descritas como gram-negativas do domínio Bacteria, todas são móveis por flagelos e todas exibem uma resposta negativa táctica e/ou de crescimento para concentrações atmosféricas de oxigênio. Bactérias magnetotáticas são fáceis de detectar em amostras coletadas de ambientes naturais através do isolamento magnético (Lins *et al.*, 2003). Essas bactérias são encontradas em sedimentos aquáticos, colunas estratificadas de água (Schüler & Frankel, 1999) e solos alagados (Fassabinder *et al.*, 1990)

e habitam principalmente quimioclina (Schüler & Frankel, 1999; Simmons *et al.*, 2004). O cultivo das bactérias magnetotáticas em cultura pura é difícil devido à sensibilidade das mesmas a concentrações relativamente baixas de oxigênio (elas são microaerófilas obrigatórias, anaeróbias ou ambos). Existem poucas espécies de bactérias magnetotáticas disponíveis em cultura pura e as células da maioria das cepas cultivadas produzem magnetossomos somente em uma faixa estreita de concentração de oxigênio (Bazylinski & Frankel, 2004).

Entre as bactérias disponíveis em cultura pura estão: várias espécies do gênero *Magnetospirillum*, incluindo espécies caracterizadas de forma válida e diversas estirpes parcialmente caracterizadas, o coco marinho MC-1 (DeLong *et al.*, 1993), os vibriões marinhos MV-1 (Bazylinski *et al.*, 1988) e MV-2 (Meldrum *et al.*, 1993b), o espirilo marinho MMS-1 (Meldrum *et al.*, 1993b; Bazylinski & Williams, 2006), e o bacilo redutor de sulfato *Desulfovibrio magneticus* RS-1 (Sakaguchi *et al.*, 1993; Sakaguchi *et al.*, 2002), todas produtoras de magnetita.

Diversas bactérias magnetotáticas não cultivadas também são estudadas de forma detalhada devido ao isolamento magnético. Entre elas estão: ‘*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*’, que é um bacilo grande encontrado em lagos de água doce (Spring *et al.*, 1993) e as bactérias multicelulares magnetotáticas, que são microrganismos multicelulares esféricos compostos de diversas células gram negativas (Rodgers *et al.*, 1990; Abreu *et al.*, 2007). Não existem bactérias magnetotáticas produtoras de magnetossomos de sulfeto de ferro disponíveis em cultura pura.

1.2. Magnetotaxia

O campo magnético interage com os magnetossomos da mesma maneira que interage com a agulha da bússola. A célula, com seu momento magnético orientado segundo um ângulo com campo magnético ambiente local, sofre um torque tendendo a alinhá-la na

direção do campo. Por outro lado, quando o momento magnético dos cristais está alinhado às linhas do campo não há força exercida sobre a célula (Blakemore, 1982).

O campo geomagnético é inclinado para baixo em relação à horizontal no hemisfério norte e para cima no hemisfério sul, com a magnitude da inclinação aumentando do equador para os pólos (Figura 1). As bactérias magnetotáticas do hemisfério norte nadam preferencialmente paralelas ao campo magnético, que corresponde a uma migração em direção ao norte do campo geomagnético (Blakemore *et al.*, 1980). Bactérias do hemisfério sul nadam preferencialmente antiparalelamente ao campo magnético. Assim, as células encontradas em ambos os hemisférios nadam para baixo em direção ao sedimento junto às linhas inclinadas do campo magnético.

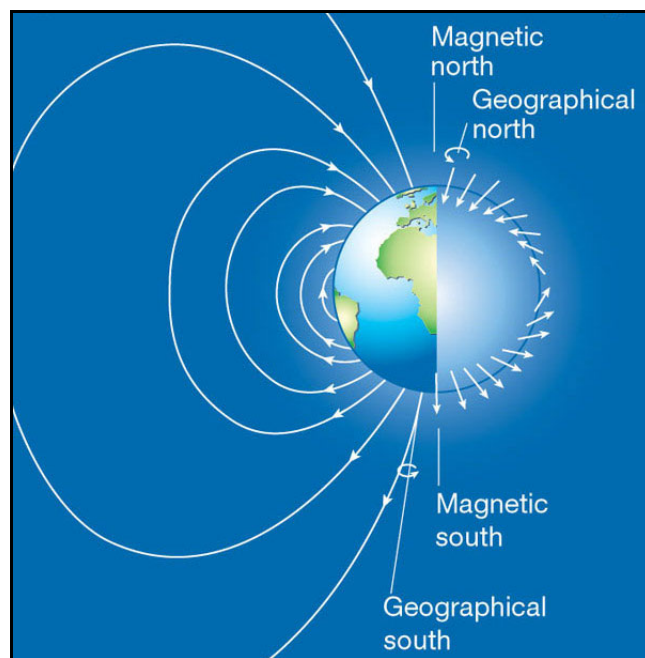


Figura 1: As linhas do campo geomagnético estão representadas por setas, indicando sua inclinação em diferentes pontos da Terra.

Inicialmente, considerava-se que a magnetotaxia ajudava a guiar as células para regiões menos oxigenadas do seu ambiente (o sedimento), onde elas poderiam parar de nadar e aderir a partículas de sedimento. Se deslocadas dos sedimentos para cima na coluna d'água, elas usariam o campo magnético para orientá-los e migrar novamente para baixo (Blakemore, 1982).

No entanto, Frankel et al. (1997) descreveu cocos magnéticos que formam bandas microaerófilas de células em um meio semi-sólido com gradiente de oxigênio. O modelo original de magnetotaxia não é suficiente para explicar o comportamento dessas bactérias magnéticas. Experimentos envolvendo várias cepas de bactérias magnetotáticas com magnetossomos de magnetita (Fe_3O_4) em finos tubos capilares com gradientes de concentração de oxigênio mostraram claramente que a magnetotaxia e aerotaxia trabalham em conjunto nessas bactérias. Aerotaxia é a resposta pela qual a bactéria migra para uma concentração de oxigênio ótima em um gradiente de oxigênio. Foi demonstrado que, em meio aquoso, bactérias magnetotáticas que nadam em uma direção podem reverter sua direção quando a concentração de oxigênio é maior que uma concentração limite. O comportamento conjunto da aerotaxia e a magnetotaxia observado foi chamado de magnetoaerotaxia (Frankel *et al.*, 1997).

Dois tipos diferentes de magnetoaerotaxia foram observados em diferentes cepas de bactérias magnetotáticas: polar e axial. As cepas com magnetoaerotaxia polar nadam persistentemente em um sentido ao longo do campo magnético, sendo elas a maioria das bactérias naturais não cultivadas. Já aquelas com magnetoaerotaxia axial nadam em ambos sentidos ao longo das linhas do campo magnético com freqüentes e espontâneas reversões no sentido (Frankel *et al.*, 1997).

A atuação conjunta dos magnetossomos com os flagelos fornece às bactérias magnetotáticas um mecanismo eficiente de localização de nichos ecológicos apropriados (Bazylinski & Frankel, 2004). O campo magnético dá o eixo e sentido de mobilidade para bactérias na magnetotaxia polar, enquanto somente fornece o eixo para mobilidade na magnetotaxia do tipo axial. Em ambos os casos, a magnetotaxia aumenta a eficiência da aerotaxia em gradientes de concentração vertical por reduzir uma procura tridimensional para uma única dimensão (Frankel *et al.*, 1997). É possível, e talvez até provável

(considerando que os produtores de greigita (Fe_3S_4) também parecem ocupar uma profundidade discreta na zona anaeróbica da coluna d'água de lagos quimicamente estratificados), que haja outras formas de quimiotaxia associada a magnetotaxia em resposta a outras moléculas ou íons, além do oxigênio, em bactérias que habitam a região anaeróbia de ambientes estratificados (Simmons *et al.*, 2004).

1.3. Diversidade morfológica e filogenética

A filogenia das bactérias magnetotáticas, cultivadas ou não, foi determinada pelo sequenciamento dos genes que codificam o gene rRNA 16S. As espécies validamente descritas do gênero *Magnetospirillum* são: *M. magnetotacticum*, *M. magneticum* e *M. gryphiswaldense*. Elas são encontradas em ambientes de água doce e exibem magnetoaerotaxia axial. Esses espirilos têm dimensões variando entre 0,2 a 0,7 de largura e 1 a 20 μm de comprimento, e seus flagelos são bipolares monotríqueos. Eles produzem cristais cuboctaédricos de magnetita com aproximadamente 42 nm em diâmetro, arranjados numa única cadeia no eixo longo da célula (Spring & Bazylinski, 2000). Esses microrganismos produzem magnetossomos somente em condições de crescimento microaerófilas (Burgess *et al.*, 1993). No entanto, a cepa de *M. magneticum* AMB-1 também sintetiza magnetita em condições aeróbias. O gênero *Magnetospirillum* pertence ao subgrupo alfa das Proteobacterias. Os genomas dos *M. gryphiswaldense* MRS-1, *M. magneticum* AMB-1 e *M. magnetotacticum* MS-1 já foram seqüenciados (Richter *et al.*, 2007).

Desulfovibrio magneticus RS-1 é um vibrio redutor de sulfato com 3 a 5 μm de comprimento e 0,9 a 1,5 μm de largura. Ele é anaeróbio obrigatório com um único flagelo polar (Sakaguchi *et al.*, 1993; Sakaguchi *et al.*, 2002). Os cristais dos magnetossomos são de magnetita com o formato irregular alongado, incluindo alguns com formato ponta de lança. Os magnetossomos medem cerca de 40 nm e se organizam em uma cadeia com até

15 magnetossomos. No entanto, essa cadeia é muitas vezes falha, com distancias grandes entre os magnetossomos. Dependendo do meio em que crescem, as células produzem mais ou menos magnetita, sendo que muitas células não produzem magnetossomos. As células têm uma resposta magnetotática fraca, devido ao tamanho reduzido dos cristais e à organização falha dos magnetossomos em cadeia (Pósfai *et al.*, 2006). Além dos magnetossomos, esse microrganismo é capaz de precipitar hematita e sulfeto de ferro extracelularmente (Sakaguchi *et al.*, 1993). Ele exibe magnetotaxia axial combinada com uma forte anaerotaxia o que reflete seu metabolismo estritamente anaeróbio. *Desulfovibrio magneticus* RS-1 pertence ao subgrupo delta das Proteobacterias (Kawaguchi *et al.*, 1995).

Os cocos marinhos MC-1 representam os únicos cocos cultivado até hoje. As células medem 1 a 2 μm de diâmetro e contém grânulos de enxofre (Meldrum *et al.*, 1993a). Elas são móveis devido a dois tufo de flagelos adjacentes em um dos lados da célula (Frankel *et al.*, 1997). Esse microrganismo é microaerófilo obrigatório. Seu genoma já foi seqüenciado e ele pertence ao subgrupo alfa das Proteobactérias (Richter *et al.*, 2007). Ele biomineraliza cristais de magnetita nos magnetossomos com o formato pseudo-hexagonal prismático com 70 a 100 nm de comprimento que estão organizados em uma única cadeia de 5 a 14 magnetossomos. A cadeia de magnetita está orientada perpendicularmente entre as duas bases dos tufo flagelares. Diferentes meios de cultura levam a mudanças na forma e na quantidade de cristais de magnetita (Meldrum *et al.*, 1993a; Devouard *et al.*, 1998). Essa morfologia de magnetita não é comum e a produção de magnetita continua mesmo quando o meio contém sulfeto indicando que o processo de biomineralização desses magnetossomos tem um elevado controle genético. Ele exibe magnetoaerotaxia polar (Frankel *et al.*, 1997).

Os vibriões marinhos magnetotáticos MV-1 e MV-2 são cepas muito parecidas da mesma espécie pertencentes ao subgrupo alfa das Proteobacterias (Meldrum *et al.*, 1993b;

Dean & Bazylinski, 1999). As células da cepa MV-1 são pequenas, com 1-5 µm por 0,2-0,5 µm e possuem um flagelo polar. Elas biomineralizam magnetossomos com cristais prismáticos de magnetita (Clemett *et al.*, 2002) medindo cerca de 53 por 35 nm organizados em uma cadeia com cerca de 10 magnetossomos (Sparks *et al.*, 1990).

O '*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*' é uma bactéria magnetotática não cultivada, encontrada em sedimentos do Lago Chiemsee (Alemanha). A primeira descrição dessa bactéria foi feita por Vali *et al.* (1987), e mais tarde bactérias similares foram isoladas de outros ambientes de água doce na Alemanha e no Brasil. Após verificar a relação filogenética entre eles, esses microrganismos receberam o status de Candidatus em 1993 (Spring *et al.*, 1993) devido às suas características fenotípicas que os distinguem das demais bactérias magnetotáticas. Elas pertencem ao filo Nitrospira. Os '*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*' são grandes bastonetes de dimensões de 1 a 1,5 µm de largura e 6 a 9 µm de comprimento e possuem um tufo polar de flagelos. A característica mais impressionante é a presença de um número grande de magnetossomos por célula, podendo chegar até 1000 magnetossomos. Os magnetossomos consistem de cristais de magnetita, com forma de ponta de lança, de tamanho entre 110 a 150 nm. Os magnetossomos estão arranjados em 3 a 5 feixes de cadeias posicionados adjacentes ao envelope celular (Spring *et al.*, 1993; Hanzlik *et al.*, 1996).

As bactérias multicelulares magnetotáticas são microrganismos esféricos compostos de diversas bactérias gram-negativas capazes de se alinhar e nadar como uma unidade devido aos flagelos. Os magnetossomos são compostos de cristais de sulfeto de ferro equidimensionais e irregulares. Elas já foram observadas em várias partes do mundo, tanto no hemisfério norte como no hemisfério sul, mas ainda não são cultivados. Elas foram primeiramente descritas por Farina *et al.* (1983) e chamadas de agregados multicelulares magnetotáticos (MMA). Esse microrganismo, encontrado no sedimento da Lagoa Rodrigo

de Freitas, no Rio de Janeiro, tem de 5 a 7 μm de diâmetro e é formado por aproximadamente 15 a 25 células individuais (Lins & Farina, 1999). Microrganismos semelhantes chamados de “Many-celled Magnetotactic Prokaryote” (MMP) foram observados na América do Norte e Europa (Mann *et al.*, 1990). Apesar de terem sido encontrados em locais distintos, as bactérias multicelulares magnetotáticas da Lagoa Rodrigo de Freitas e de New England são muito semelhantes em relação à morfologia e movimentação. Foram encontrados microrganismos semelhantes com MMA e MMP também em grande quantidade em sedimentos da Lagoa de Araruama, Rio de Janeiro. A abundância e o fato de serem os únicos microrganismos magnetotáticos na lagoa possibilitaram a descrição detalhada de sua morfologia e organização celular. Estes microrganismos receberam o nome de ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ (Abreu *et al.*, 2007). A análise filogenética mostra que o MMP e o ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ pertencem ao grupo das bactérias redutoras de sulfato do subgrupo delta das Proteobacterias (DeLong *et al.*, 1993; Abreu *et al.*, 2007). No entanto, os MMPs apresentaram uma diversidade filogenética surpreendente na população descrita por Simmons & Edwards (2007), sendo identificadas espécies diferentes no mesmo ambiente. As bactérias magnetotáticas multicelulares podem representar um gênero com diversas espécies diferentes, incluindo o MMP, MMA e o ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ (Simmons & Edwards, 2007).

Uma bactéria multicelular magnetotática isolada da Lagoa de Itaipu no Rio de Janeiro biomineraliza magnetossomos de greigita e magnetita. Os cristais de greigita são equidimensionais irregulares e os cristais de magnetita têm o formato de ponta de lança. As bactérias multicelulares magnetotáticas descritas podiam ter somente magnetossomos de greigita, somente magnetossomos de magnetita ou ambos juntos (Lins *et al.*, 2007). Um bastonete não cultivado também é conhecido por produzir magnetossomos com cristais de

magnetita e de greigita (Baylinski *et al.*, 1993b). Ele nada lentamente e possui um único flagelo polar. A quantidade de um ou outro tipo de cristal parece depender do ambiente em que foi coletado, ou seja, se coletado em regiões anaeróbias, ricas em H₂S, possui principalmente cristais de greigita, e se coletado em regiões oxigenadas, possui principalmente cristais de magnetita. Nestes microrganismos, os cristais de greigita são retangulares em projeção e os cristais de magnetita são em forma de ponta-de-lança. Estas diferenças morfológicas entre os cristais de magnetita e greigita em ambos os casos relatados sugerem que os processos de mineralização de cristais de magnetita e de greigita são separados, e, portanto, existiriam dois grupos de genes diferentes para biomineralização de magnetita e de greigita (Bazylnski *et al.*, 1995).

1.4. Magnetossomos

A biomineralização pode ocorrer através de dois tipos de processos: biologicamente induzido ou biologicamente controlado. O primeiro é aquele em que o organismo não determina a morfologia, nem o tamanho do cristal formado, tendo seu papel limitado a ser um suporte ou catalisador do aumento de substâncias necessárias para a formação de minerais. No caso da biomineralização biologicamente controlada, o organismo determina o tipo de cristal a ser formado, a morfologia e o tamanho (Lowenstam & Weiner, 1989). Embora a maioria dos processos de biomineralização em procariotos seja do tipo biologicamente induzido, as bactérias magnetotáticas são uma exceção, devido a especificidade da composição química, cristalográfica e morfológica dos seus cristais. Dentro da membrana que delimita o magnetossomo, a bactéria magnetotática cria um ambiente quimicamente único que facilita a nucleação e o crescimento de cristais em uma orientação preferencial. Como consequência desse processo, a bactéria magnetotática controla a síntese, o tamanho e a morfologia dos magnetossomos. A morfologia das partículas de cristais de magnetita e greigita nos magnetossomos varia, mas é consistente

dentro das células de uma espécie ou cepa de bactérias magnetotáticas (Bazylinski & Frankel, 2004).

O primeiro passo para a formação dos magnetossomos de magnetita em espécies de *Magnetospirillum* seria a invaginação da membrana citoplasmática, formando o ambiente controlado para a biomineralização dos cristais magnéticos. Essa invaginação pode permanecer ligada à membrana citoplasmática ou não, formando vesículas (Komeili *et al.*, 2006). Essa vesícula tem um grupo de proteínas específicas, que não são encontradas na membrana citoplasmática, chamadas de proteínas da membrana dos magnetossomos (Tanaka *et al.*, 2006). A vesícula e essas proteínas são responsáveis pelo controle exercido pelas bactérias magnetotáticas na biomineralização dos cristais magnéticos (Grünberg *et al.*, 2004). A biomineralização de magnetita acontece de forma simultânea nas vesículas em cadeia e no mesmo local em cada uma (Komeili *et al.*, 2004).

A magnetita formada pelas bactérias magnetotáticas tem alta perfeição estrutural e em geral, medem de 35 a 120nm de comprimento (Spring & Bazylinski, 2000). A maioria dos cristais de magnetita é livre de defeitos estruturais. A composição mineral dos cristais de magnetita parece estar sobre estrito controle químico, pois mesmo quando há sulfeto de hidrogênio presente no meio de crescimento, células de várias culturas de bactérias magnetotáticas continuam a sintetizar magnetita e não greigita (Meldrum *et al.*, 1993a; Meldrum *et al.*, 1993b). Os cristais de magnetita em magnetossomos são de alta pureza química (Bazylinski *et al.*, 1995; Spring & Bazylinski, 2000). São raros os casos de impureza de outros íons metálicos, dentro dos cristais (Towe & Moench, 1981) e não foram encontradas proteínas dentro dos cristais (Arakaki *et al.*, 2003). Os cristais de magnetita são espécie-específicos, e foram descritos com três morfologias principais: cubo octaédrico, prismático e ponta de lança. O tamanho e a forma dos cristais de magnetita podem ser afetados levemente por variações nos meios de cultura (Komeili *et al.*, 2006).

Nos magnetossomos de sulfeto de ferro, mais de um tipo de mineral de sulfeto de ferro foi identificado, incluindo mackinawita (FeS tetragonal) e FeS cúbico, que são considerados como precursores de greigita (Fe₃S₄) em sistemas inorgânicos. Deste modo, foi proposta uma via de formação para os cristais de greigita das bactérias magnetotáticas: FeS cúbico se transformaria em mackinawita, que por sua vez se transformaria em greigita. Os cristais variam de 30 a 120nm de comprimento (Pósfai *et al.*, 1998a; Pósfai *et al.*, 1998b). Não há estudos sobre a composição das membranas de magnetossomos de sulfeto de ferro.

Em cristais de sulfeto de ferro já foi relatado que, em certas condições, concentrações significantes de cobre podem se incorporar nos magnetossomos. No entanto, essa associação com o cobre parece ser limitada aos MMPs e ao lugar de coleta. O fato que os magnetossomos dos MMPs nem sempre contém cobre, sugere que a deposição de cobre em magnetossomos desses organismos é um processo não específico. Essa informação parece indicar que o processo de biomineralização envolvendo produção de magnetossomos em MMPs não é tão controlado como em outras bactérias magnetotáticas (Bazylinski *et al.*, 1993a; Pósfai *et al.*, 1998b).

Como não há cepas de bactérias magnetotáticas com magnetossomos de sulfeto de ferro em cultura pura, muito pouco se conhece sobre como, e em que condições, esses organismos sintetizam sulfeto de ferro. No entanto, devido às condições anaeróbicas e concentrações de enxofre dos locais em que eles são geralmente encontrados, é provável que a biomineralização de sulfeto de ferro pelas bactérias magnetotáticas ocorra somente na ausência de oxigênio (Bazylinski & Frankel, 2004).

1.5. Disposição celular dos magnetossomos

Nas bactérias magnetotáticas, os magnetossomos estão arranjados em uma ou mais cadeias. A organização dos magnetossomos em cadeia leva a soma dos momentos

magnéticos dos magnetossomos individuais, fornecendo um momento magnético total. A cadeia de magnetossomos em bactérias magnetotáticas funciona, então, como um único dipolo magnético. O momento magnético total da célula é grande o suficiente para que sua interação com o campo geomagnético supere as perturbações que tendem a prejudicar a orientação celular em ambientes aquáticos (Frankel, 1984).

A habilidade de manter os magnetossomos alinhados é uma incógnita já que as membranas compostas de bicamada lipídica são fluidas, e os cristais de magnetita poderiam mover-se ou rodar livres dentro das suas vesículas. Similarmente, as vesículas contendo magnetita deveriam se mover relativas umas as outras, em resposta às interações magnéticas locais, a não ser que estejam presas (Kobayashi *et al.*, 2006). Em *Magnetospirillum magneticum* sp. AMB-1 foram descritos filamentos de uma proteína “actin-like”, MamK, que parece cruzar todo o comprimento da célula, e poderia agir estabelecendo uma localização específica da cadeia ou poderia ser importante para a manutenção da cadeia após a produção dos magnetossomos, apoiando a idéia de que estruturas externas limitam o movimento dos magnetossomos. Essa proteína é homóloga à proteína MreB, que forma filamentos e tem sido implicada na determinação da forma celular, estabelecimento da polaridade da célula, e segregação de cromossomos (Komeili *et al.*, 2006). Em *Magnetospirillum gryphiswaldense* foi relatada uma proteína, MamJ, que interage tanto com a membrana do magnetossomo, assim como a estrutura filamentosa. Em um mutante $\Delta mamJ$, os magnetossomos estavam dispersos no citoplasma e encontravam-se dissociados da estrutura filamentosa ainda presente, indicando que essa proteína conecta as vesículas dos magnetossomos à estrutura filamentosa. A proteína MamJ é necessária para o alinhamento dos magnetossomos ao longo da estrutura filamentosa em bactérias magnetotáticas. O gene da proteína MamJ é co-transcrito com o gene da proteína MamK (Scheffel *et al.*, 2006).

Existe um contraste entre o comportamento magnético dos magnetossomos de greigita e os magnetossomos de magnetita. Em todas as cepas produtoras de magnetita que foram estudadas por holografia de elétrons, os cristais de magnetita foram organizados em cadeias relativamente retas, com cada partícula alinhada ao eixo da cadeia, resultando em uma indução magnética uniforme ao longo da cadeia, em termos de magnitude e direção. O controle biológico restrito que resulta em morfologias uniformes, tamanhos e orientações dos magnetossomos de magnetita aparentam ser mais fracos em bactérias produtoras de greigita, talvez como resultado de um processo de biomineralização diferente. As formas e orientações variadas nos magnetossomos de greigita resultam em um campo magnético variável ao longo da cadeia. No entanto, a cadeia contém tantos magnetossomos que coletivamente produzem um momento magnético geral que é paralelo ao eixo da célula e permite que a mesma oriente-se ao longo das linhas do campo magnético (Kasama *et al.*, 2006).

Alternativamente, em cocos magnetotáticos não cultivados com duas cadeias de magnetossomos e em '*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*', foi proposto que as cadeias ou feixes se repelem umas as outras, pressionando as mesmas diretamente contra a membrana celular. Assim, o torque magnético que age nas cadeias é transferido para a célula, alinhando-a com o campo geomagnético (Hanzlik *et al.*, 1996).

Os feixes de cadeias de magnetossomos em '*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*' posicionam os magnetossomos lado a lado. No entanto, para que as forças de repulsão entre os magnetossomos não afetem a integridade do feixe, os cristais adjacentes têm que estar organizados de modo que as polaridades opostas se aproximem, permitindo assim cadeias duplas. Nesse microrganismo não foi identificada uma estrutura vesicular envolvendo os cristais de magnetita, porém foi observada uma camada levemente eletrondensa na base do cristal, onde se supõem que esteja o arcabouço para a formação do

mesmo. Foi sugerido então um mecanismo de crescimento de cristais baseado em arcabouço protéico que estariam organizados como uma árvore (Hanzlik *et al.*, 2002).

1.6. ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’

1.6.1. Características

‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ é um microrganismo esférico com cerca de 7 μm de diâmetro e contém em média 17 células (Keim *et al.*, 2004a; Abreu *et al.*, 2007). A diversidade genética foi analisada e foi verificado que os ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ são idênticos entre si, assim como suas células (Keim *et al.*, 2004b). Ao contrário da diversidade descrita em outro local (Simmons & Edwards, 2007), é a única espécie de bactéria magnetotática multicelular encontrada na Lagoa de Araruama (Abreu *et al.*, 2007).

As células do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ são arranjadas radialmente em torno de um compartimento acelular interno localizado no centro do microrganismo. Todas as suas células têm contato tanto com o compartimento interno como o ambiente externo, formando uma esfera oca (Figura 2). As células têm o formato piramidal, tendo as faces da pirâmide no contato entre duas células, e as arestas da pirâmide no contato entre três ou mais células (Figura 2; Keim *et al.*, 2004a). A ligação com as células vizinhas pode ser o fator principal na deformação e no arranjo das células no microrganismo. As células dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ são muito próximas umas das outras, e as membranas externas de duas células adjacentes apresentam regiões de distância constante que é um indicativo de uma estrutura especializada ligando as duas células (Keim *et al.*, 2004a). Quando esses microrganismos se desagregam, as células separadas não se movem e não se orientam no campo magnético. O ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ pode perder várias células antes de morrer, no entanto, todas as células desagregadas já não são mais viáveis (Abreu *et al.*, 2006).

Esses microrganismos são recobertos externamente por cápsula composta de filamentos radialmente arranjados. Amostras processadas para microscopia eletrônica de transmissão utilizando vermelho de rutênio mostram uma cápsula altamente corada, indicando riqueza em polissacarídeos (Keim *et al.*, 2004a).

Um compartimento interno encontrado no centro do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’, com o qual todas as células têm contato, é possivelmente utilizado para comunicação celular (Figura 2), já que pequenas concentrações de moléculas solúveis poderiam rapidamente atingir todas as células do organismo nesse espaço fechado. Vesículas de membrana observadas no compartimento interno também poderiam transmitir sinais químicos de uma célula para as outras (Keim *et al.*, 2004a).

As células dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ contêm grandes inclusões de lipídios e/ou polihidroxialcanoato e seus magnetossomos são encontrados principalmente próximos à periferia dos organismos. Os magnetossomos estão normalmente associados com uma estrutura contendo estrias periódicas, mostradas pela primeira vez em Farina *et al.* (1983). Essa estrutura tem cerca de 40 nm de largura e pode ter como função a manutenção das cadeias dos magnetossomos na posição correta na célula, perto da superfície da célula em contato com o ambiente externo (Silva *et al.*, 2007). Ainda não foi determinado se essa estrutura contém filamentos protéicos de citoesqueleto como descrito em bactérias magnetotáticas produtoras de magnetita (Komeili *et al.*, 2006; Scheffel *et al.*, 2006).

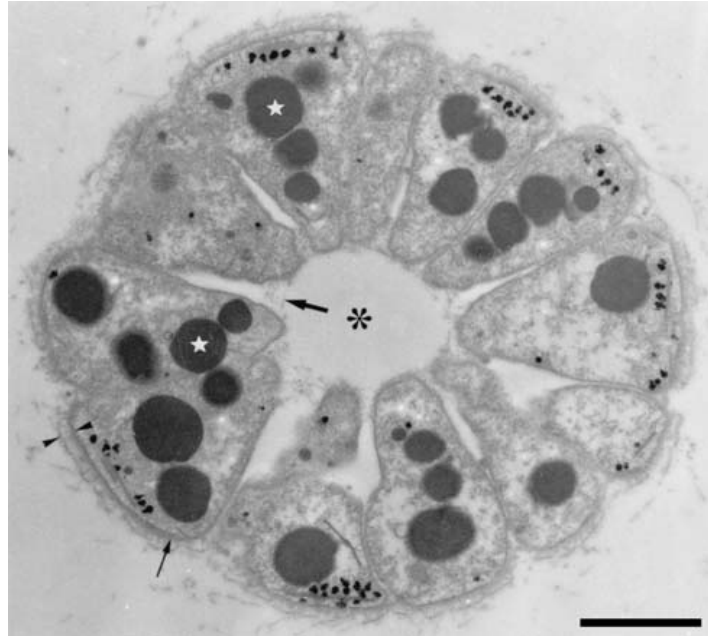


Figura 2: Micrografia eletrônica de transmissão de corte ultrafino dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ preparados com vermelho de rutênio mostrando a localização geral das células e o compartimento interno (asterisco). Todas as células têm uma membrana dupla característica de bactérias gram-negativas (seta pequena) e tem contato tanto com o ambiente externo quanto com o compartimento interno. O compartimento interno é acelular e é cercado de um cinturão de filamentos (seta grande) ligado ao ápice das células. Muitos filamentos distribuídos radialmente cobrem externamente os organismos formando uma cápsula (cabeça de seta). Inclusões de lipídios ou polihidroxicanoatos são marcadas por estrelas. A barra indica 1 µm. Retirado de Keim et al. (2004a).

1.6.2. Ciclo biológico

Keim et al. (2004b) propuseram um ciclo biológico para os ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’. Segundo os autores todos os estágios do ciclo são multicelulares, ao contrário das demais formas multicelulares de bactérias, e o organismo se reproduz por fissão binária. Durante a maior parte do ciclo biológico as células do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ se organizam em uma esfera formada por uma única camada de células polarizadas e coordenadas, que cresce por aumento de volume celular. Em seguida, as células se dividiriam sincronicamente gerando a forma elíptica observada. Ocorre, então, uma constrição no eixo equatorial do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’, que adquire formato de oito. Através de um movimento de torção, ocorria a separação em dois organismos esféricos idênticos. Essa torção seria a melhor maneira de

separar os microrganismos “filhos” com manutenção da organização das células que os formam (Figura 3; Keim *et al.*, 2004b).

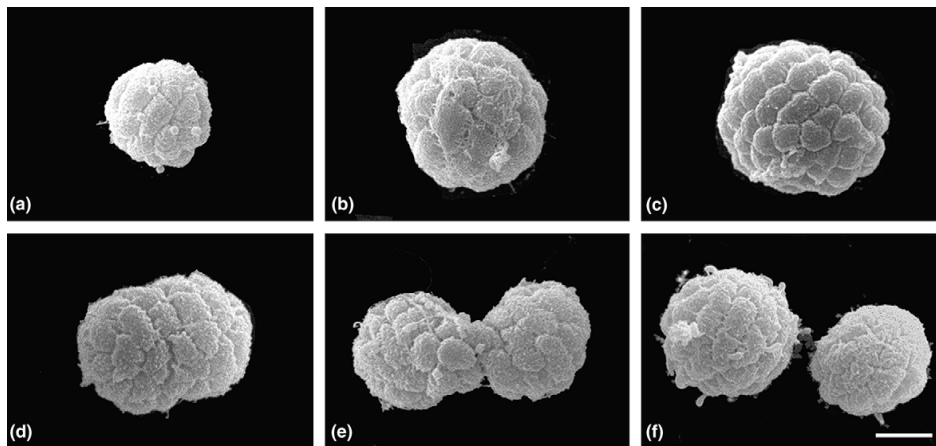


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura de indivíduos selecionados arranjados para ilustrar a sequência presumida do ciclo biológico dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’. Inicialmente (a), o organismo é pequeno e esférico; (b) enquanto cresce, o tamanho das células aumenta, mas não o número de células. Mais tarde (c), as células dividiriam sincronicamente sem separação e o organismo contém um número maior de células menores. Em seguida (d), o ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ se tornaria elíptico e então (e) em forma de oito, como dois organismos ligados. Finalmente (f), o organismo se dividiria em 2 organismos iguais. A barra indica 4 μm . Retirado de Keim *et al.* (2004b).

A hipótese de divisão celular coordenada e sincrônica é fortalecida pela presença de dois picos no histograma de número de células nos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ e pela observação, por microscopia eletrônica de transmissão, de várias células contendo invaginações indicativas de divisão celular em cortes ultrafinos. A invaginação é orientada radialmente e sempre começa pela parte da célula em contato com o meio externo. Esse mecanismo preserva a organização radial das células no organismo e possibilita a divisão dos magnetossomos, de inclusões citoplasmáticas e flagelos, como ocorre em bactérias unicelulares (Keim *et al.*, 2004b). Medidas comparativas mostram que o ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ tem uma resposta magnética otimizada para o número e organização dos magnetossomos nativos, que só é possível através de um ciclo biológico multicelular (Winklholfer *et al.*, 2007), afirmando a hipótese proposta por Keim *et al.* (2004b). Esses microrganismos devem coordenar a divisão celular e a posição relativa das células filhas para manter a polaridade de todo o microrganismo e também

para gerar dois microrganismos magnetotáticos com o mesmo comportamento magnético que o organismo original.

1.6.3. Movimento

Os ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ contém flagelos encontrados exclusivamente na parte da célula em contato com o ambiente, com cerca de 30 flagelos por célula. Os flagelos não têm um comprimento de onda completo e estão paralelos uns aos outros e aproximadamente ao mesmo ângulo com a superfície do microrganismo (Silva *et al.*, 2007).

Nos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’, a posição dos flagelos, a velocidade, e a direção da rotação têm que ser coordenadas para obter o movimento para frente e para trás. De fato, esses microrganismos se movem com velocidades relativamente altas, de cerca de 100 $\mu\text{m/s}$ (Silva *et al.*, 2007; Farina *et al.*, 1983; Greenberg *et al.*, 2005; Rodgers *et al.*, 1990). No entanto, não é claro como os muitos flagelos observados nesse microrganismo funcionam.

Keim *et al.* (2007) propuseram 4 tipos de movimento para ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ submetidos a um campo magnético homogêneo: movimento livre, rotação, “walking” e movimento de escape (“ping-pong”). No movimento livre, eles nadam em uma trajetória reta ou helicoidal que pode chegar até $90 \mu\text{m/s} \pm 20 \mu\text{m/s}$. No entanto, a velocidade pode variar de uma amostra para outra e também devido ao tempo de observação no microscópio. Os ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ nadam em uma trajetória helicoidal com o eixo de simetria alinhado com o campo magnético. Na rotação, os microrganismos que são observados na borda de uma gota ou que foram retidos por algum obstáculo giram sobre um eixo que passa pelo centro do microrganismo. No movimento chamado de “walking”, os ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ nadam a uma velocidade constante em um movimento de alça (looping motion) perto da interface

água-ar em campos magnéticos de intensidade parecida com o campo geomagnético. Foi observado que, quando esses microrganismos atingem a interface, eles nadam em uma trajetória complexa, mantendo o mesmo sentido de rotação. Nessa situação, eles não apresentam movimento de escape (Keim *et al.*, 2007).

Os ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ nadam em trajetória helicoidal em direção do limite da gota e então se movimentam para frente e para trás em um movimento de escape, também chamado de “ping-pong”. Ainda não é conhecido o mecanismo que inicia o movimento de escape. A aceleração e desaceleração uniforme durante a excursão do movimento foram atribuídas a variações de força de propulsão do flagelo. Assim, a propulsão flagelar é mais forte no início e, posteriormente, o microrganismo vai diminuindo uniformemente a velocidade com o tempo ao se movimentar no sentido oposto do campo magnético. Quando está fazendo a excursão de volta, há um claro aumento na velocidade. Foi observado que, em MMPs, o movimento de “ping-pong” ocorre com mais frequência quando o campo magnético aplicado é maior (0.08 a 1.7 mT) que o campo geomagnético. A distribuição das distâncias percorridas pelo movimento de escape de cada microrganismo varia de acordo com o campo magnético aplicado, o que não pode ser explicado pelo modelo de magnetotaxia convencional. E ainda, as excursões não terminam até que uma distância mínima tenha sido percorrida. Esses resultados sugerem a existência de um regulador celular interno de magnetorecepção pelo menos para campos magnéticos maiores do que o da Terra (Greenberg *et al.*, 2005; Keim *et al.*, 2007).

1.7. Justificativa

Os ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ apresentam uma organização celular complexa. O fato de suas células estarem dispostas radialmente formando um morfotipo esférico leva ao questionamento de como os magnetossomos estão arranjados de modo que esse microrganismo apresente o comportamento magnetotático. Winklholfer *et al.* (2007)

mostrou que o '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' tem uma resposta magnética otimizada para o número e organização dos magnetossomos nativos. Não se conhece a disposição real dos magnetossomos nos '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*', que é importante no comportamento magnetotático, pois a maioria dos momentos magnéticos desses magnetossomos nas cadeias deve estar alinhada para que o momento magnético total seja otimizado. Por isso, é essencial elucidar a distribuição dos magnetossomos nos '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a distribuição dos magnetossomos nos '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' e sua relação com o ciclo biológico.

2.2. Objetivos específicos

- Construir um modelo tridimensional da distribuição dos magnetossomos dos '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' através de reconstrução tridimensional de cortes seriados semifinos observados por microscopia eletrônica de transmissão.

- Caracterizar a ultraestrutura dos magnetossomos presentes nestes '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*', com relação ao tamanho e morfologia do cristal magnético.

- Caracterizar as diferenças estruturais nas cadeias de magnetossomos em células viáveis e não viáveis dos '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' por microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão.

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta de amostras

O sedimento da praia da Baleia na Lagoa de Araruama ($22^{\circ} 50'S$ $42^{\circ} 13'W$), situada na cidade de São Pedro da Aldeia, no estado do Rio de Janeiro (Figura 4), foi coletado em recipientes de plástico de boca larga de 1000mL ou em recipientes de plástico de 30L onde foram mantidos à temperatura ambiente no laboratório.

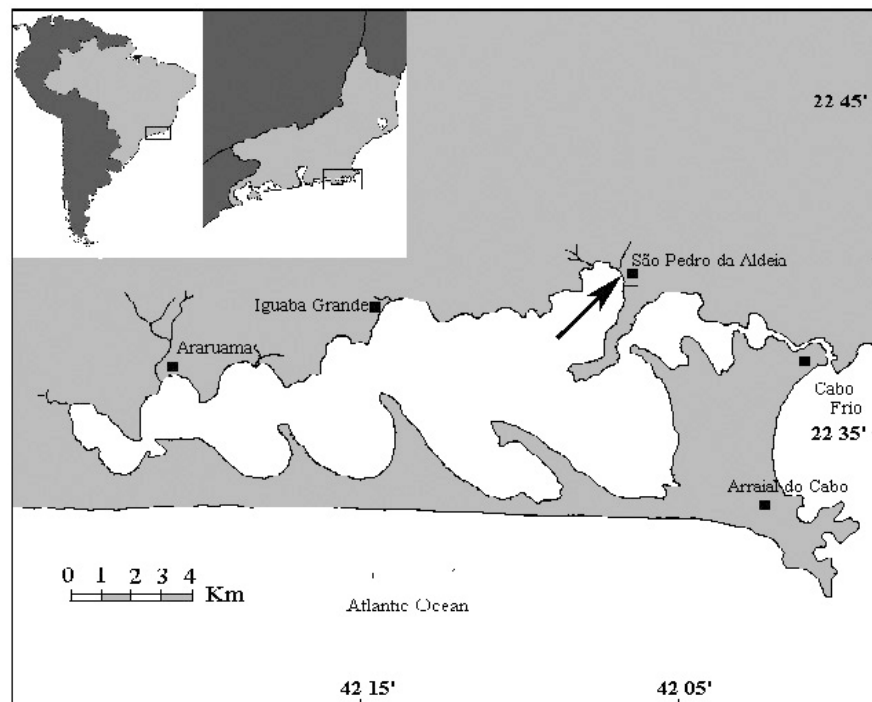


Figura 4: Mapa da Lagoa de Araruama, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Praia da Baleia é situada na cidade de São Pedro da Aldeia (seta).

3.2. Isolamento magnético

O sedimento foi colocado em um recipiente apropriado para a concentração (Figura 5), e esse foi exposto a um campo magnético gerado por uma bobina fabricada artesanalmente (Figura 6). Após 45 minutos, o concentrado de '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' foi coletado com auxílio de um tubo capilar (Lins *et al.*, 2003).



Figura 5 – Recipiente para concentração dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’; a barra indica 3 cm.

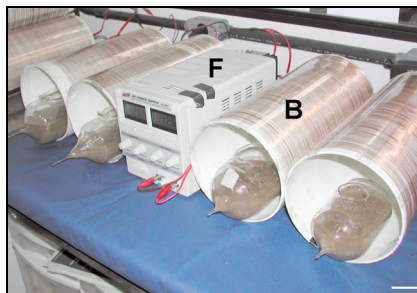


Figura 6 – Bobina (B) e fonte de corrente contínua (F) para concentração dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’’. A barra indica 5 cm.

3.3. Purificação do concentrado

O concentrado dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ foi colocado em um tubo de polietileno (1,5 ml) com um ímã colocado externamente no tubo, na polaridade apropriada, retendo os microrganismos na parede do mesmo. Eles foram então lavados cuidadosamente com água da lagoa filtrada (filtro de 0,2 μm Millipore). Em seguida, o ímã foi deslocado para o fundo do tubo, onde houve a concentração dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ para o posterior processamento.

3.4. Microscopia de Luz

3.4.1. Campo Claro

O concentrado de ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ purificado foi observado em microscopia óptica de campo claro. Esses microrganismos foram observados vivos ou tratados com água destilada. Água destilada foi adicionada à concentração de ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ purificada de modo a baixar à $\frac{1}{4}$ a salinidade da água da

lagoa com o objetivo de desagregar as células dos microrganismos. A amostra foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente. Os microrganismos foram fotografados com a câmera digital Color View XS e filmados com uma câmera JVC em um microscópio óptico Zeiss Axioplan 2.

3.4.2. Fluorescência

Uma suspensão de 2 µL contendo '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' foi depositada em uma lamínula previamente tratada com polietilenimida por 5 minutos. Adicionou-se 2µL do corante lipofílico FM 1-43 (10µg/ml; Molecular Probes) na gota. Após 10 minutos a lamina foi observada no microscópio óptico de fluorescência Zeiss Axioplan 2 e fotografados com a câmera digital Color View XS.

3.5. Microscopia eletrônica de transmissão

3.5.1. Células inteiras, não contrastadas

Uma suspensão de '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' foi depositada em grades de cobre de 200 mesh com filme de formvar previamente vaporizadas com carbono. As grades foram secas com papel de filtro e foram observadas no microscópio FEI Morgani operando em 100 KV e fotografadas em filme ortocromático. Os filmes foram escaneados no scanner Epson Perfection 3200.

3.5.2. Cortes Ultrafinos

- Protocolo sem Tetróxido de Ósmio

A concentração de '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' purificada foi fixada em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) em água da lagoa durante 2 horas à temperatura ambiente. Na etapa seguinte foram feitas três lavagens de aproximadamente 15 minutos cada etapa usando tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) em água da lagoa. A amostra foi desidratada por 15 minutos cada etapa em acetona 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (três vezes). Em seguida, a amostra foi incluída à

temperatura ambiente com resina EMBED-812 (Electron Microscopy Sciences, Hattfield, P.A.), que seguiu o seguinte processo: solução de acetona/resina 2:1 por 24 horas, solução acetona/resina 1:1 por 24 horas, solução de 1:2 por 24 horas a temperatura ambiente, resina pura por 24 horas. Após a polimerização, a 60°C na estufa por 72 horas, os cortes ultrafinos foram feitos em um ultramicrotomo Reichert Ultracut com navalha de diamante. Os cortes foram observados em um microscópio FEI Morgani operando em 80 e 100 KV.

- Protocolo de ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ desagregados

Água destilada foi adicionada à concentração de ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ purificada de modo a baixar em ¼ a salinidade da água da lagoa com o objetivo de desagregar as células dos microrganismos. A amostra foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células desagregadas foram processadas de acordo com o protocolo descrito acima.

3.5.3. Modelo tridimensional

O material processado pelo protocolo sem tetróxido de ósmio foi usado para fazer cortes seriados com espessura nominal de 200nm em um ultramicrotomo Reichert Ultracut com navalha de diamante. A fita dos cortes seriados foi coletada por uma grade com fenda de 2mm, que foi então delicadamente depositada sobre um filme de formvar em um suporte de acrílico (Figura 7). Alguns cortes seriados foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2,5% por 1 hora, lavados em água destilada, e citrato de chumbo por 1 minuto e lavados novamente em água destilada ainda sobre o suporte. Após a contrastação, a grade foi retirada gentilmente do suporte e foi observada em um microscópio FEI Morgagni em 100 KV.

As imagens dos cortes seriados foram então processadas no programa *Reconstruct* (Fiala, 2005) para a obtenção de um modelo tridimensional do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’.

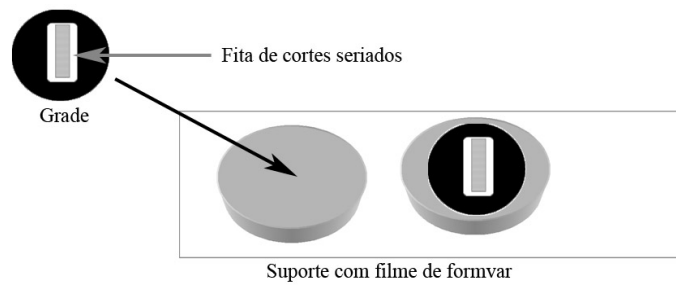


Figura 7: Grade de fenda com a fita de cortes seriados. A grade é depositada sobre o filme de formvar em um suporte de acrílico.

3.6. Análise dos dados

Os dados morfológicos dos magnetossomos foram obtidos através do programa Analysis (GmbH, Alemanha) a partir de imagens dos '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' não contrastados depositados em grades de formvar observadas no MET. Foram feitas as seguintes medidas: tamanho (Diâmetro máximo, médio e mínimo) e fator de forma (Diâmetro mínimo/Diâmetro máximo) dos magnetossomos; contagem do número de cadeias por célula, número de magnetossomos por cadeia e número de magnetossomos por célula e por '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'; localização celular dos magnetossomos.

4. RESULTADOS

Os cristais dos magnetossomos do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' têm um diâmetro médio de 83 nm (Tabela 1). A figura 08 mostra o histograma do diâmetro médio dos magnetossomos, que exibe uma curva gaussiana (Programa OriginPro 7.5). Não foram observados cristais com menos de 50 nm e foram encontrados cristais com mais de 100 nm. O fator de forma (diâmetro mínimo/diâmetro máximo) médio desses magnetossomos é 0,78 (n=746). O histograma do fator de forma mostra que a morfologia dos magnetossomos é irregular, geralmente com o formato levemente arredondado (Figura 09). Cada célula possui em média 52 magnetossomos (Tabela 01). O histograma da figura 10 mostra que há uma variação grande do número de magnetossomos por célula. Cada célula pode ter nenhum magnetossomo ou até 168 magnetossomos. Foram feitas diversas medidas do número e da organização dos magnetossomos somente em células do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' que mantinham cadeias de magnetossomos íntegras. Os magnetossomos estão organizados em cerca de 6 cadeias por célula, e cada cadeia tem em média 9 magnetossomos (Tabela 1).

Tabela 01: Medidas do diâmetro dos magnetossomos e sua distribuição nas células com as cadeias de magnetossomos formadas do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'.

	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	n
Diâmetro (nm)	83	56	163	10,1	746
Magnetossomos por célula	52	0	168	39,9	289
Cadeias por célula	6	3	11	1,9	40
Magnetossomos por cadeia	9	5	16	2,3	131

De modo a determinar a posição dos magnetossomos na célula, mediu-se a distância dos magnetossomos ao centro do microrganismo, localizado no interior do compartimento interno. Considerando a distância do centro do compartimento interno até a membrana em contato com o ambiente externo como 100%, 555 de 696 magnetossomos medidos (80%) estão localizados nas distâncias 25% mais periféricas da célula, próximas à membrana em contato com o ambiente externo (Figura 12). Os magnetossomos encontrados mais interna do microrganismo não estão organizados em cadeias. Na figura 14 podem-se observar imagens em série de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' vivo em microscopia de campo claro, onde os magnetossomos estão organizados na periferia do corpo multicelular. Do mesmo modo, em microrganismos tratados com água destilada, as células estão desagregadas, com formato ovóide, e os magnetossomos parecem ainda estar na periferia da célula, e em algumas delas pode-se observar mais de um grupo de magnetossomos (Figura 15). Abreu et al. (2006) mostrou que as células desagregadas do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' não são mais viáveis. Os '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' tratados e não tratados com água destilada foram filmados com o objetivo de observar sua resposta ao campo magnético. Os microrganismos vivos não tratados com água destilada têm uma resposta ativa ao campo, virando e nadando ativamente para a direção correspondente do campo magnético. Os microrganismos tratados com água destilada tiveram uma resposta diferente. Aqueles que ainda conseguiram manter de alguma maneira, suas células juntas, mesmo perdendo o formato esférico característico do microrganismo, apresentaram uma resposta passiva ao campo. Eles mudam a posição, virando seu corpo, com a movimentação da direção do campo magnético. Porém, aqueles microrganismos cujas células ficaram completamente desagregadas, isoladas, não tinham qualquer resposta ao campo magnético (Dados não mostrados). De modo a observar com detalhes a organização dos magnetossomos em

células de microrganismos íntegros e células desagregadas de microrganismos tratados com água destilada, foram feitos cortes ultrafinos dessas duas preparações. As células do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ íntegro têm as cadeias bem organizadas, com os magnetossomos muito próximos (Figura 16). As células dos microrganismos tratados com água destilada estão desagregadas e ovóides e os magnetossomos ainda permanecem na periferia da célula, porém as cadeias estão desorganizadas (Figura 17). A diferença de osmolaridade provocada pela água destilada, além desagregar a célula do microrganismo, parece causar a extração de material intracelular e/ou um inchaço significativo da célula (Figura 17). Esses resultados indicam que mesmo com o choque osmótico, a célula morta pode se alinhar com o campo magnético se ainda for parte do microrganismo, mesmo que ele não tenha mais o formato esférico característico. Se a célula se solta do microrganismo, ela não está mais sujeita às restrições impostas pelas células adjacentes que atuam na manutenção do formato celular, podendo causar a extração do material intracelular e/ou inchaço da célula observados. Acredita-se que haja alguma estrutura mantendo os magnetossomos de sulfeto de ferro em cadeias, como acontece nos magnetossomos de magnetita, e essa estrutura poderia ser inutilizada com a desestruturação completa da célula, o que causaria a desorganização das cadeias de magnetossomos que levaria a inércia da célula no campo magnético.

A microscopia eletrônica de transmissão das células inteiras do microrganismo desagregado mostra as cadeias de magnetossomos nas células. O número de cadeias por célula é variado, no entanto a maioria das cadeias parece estar alinhada e organizada em um ou mais grupos dentro das células (Figura 18). No entanto, nesse método, os microrganismos estão achatados devido ao processamento, provavelmente deslocando parte dos magnetossomos. Esse método é insuficiente para fornecer a distribuição tridimensional dos magnetossomos no ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’. Com

esse objetivo foi necessário fazer a reconstrução tridimensional através de cortes seriados por microscopia eletrônica de transmissão. O grande obstáculo para a reconstrução foi o protocolo de preparação para microscopia eletrônica de transmissão para cortes ultrafinos, já que a preservação do microrganismo ainda era aquém da desejada, como se pode ver na figura 02. A melhor preservação do microrganismo foi obtida com o protocolo sem pós-fixação com tetróxido de ósmio (ver figura 24), evidenciada pelo compartimento interno pequeno, as células muito próximas e a membrana celular sem ondulações. Na figura 19 observam-se imagens em série de cortes ultrafinos de 90 nm de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'. Um modelo tridimensional de uma pequena parte do microrganismo foi feito com esses cortes seriados (Figura 20). No modelo, com cerca de 1 μm de espessura, foram representados o contorno do microrganismo, as células, o compartimento interno e os magnetossomos (Figura 20A). No modelo pode-se observar que todas as células estão muito próximas umas das outras, e o formato celular é dependente do espaço disponível entre as células. Quanto mais distante do compartimento interno, o diâmetro aumenta, e com isso as células têm mais espaço para acomodar uma maior parte do volume celular. As células não são arranjadas em estruturas geométricas, cada uma em seu lugar. Elas parecem ser mais maleáveis, sendo que partes de algumas células se sobrepõem às outras, se distribuindo para ocupar o espaço disponível. Todas as células têm contato com o compartimento interno, mas somente uma parte pequena da membrana realmente faz o contato (Figura 20A). Na Figura 20B pode-se observar o mesmo modelo sem as células, onde os magnetossomos podem ser observados claramente. Eles formam cadeias e grupos de cadeia na periferia do microrganismo, e algumas cadeias parecem estar paralelas entre si. No entanto, esse modelo cobre somente uma parte pequena do microrganismo. Como o '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' tem cerca de 7 μm de diâmetro (Keim *et al.*, 2004a), outros cortes seriados foram feitos com

cerca de 200 nm de modo a conseguir um modelo maior e mais completo. No entanto, não foi possível delinear o contorno das células individuais dentro do microrganismo devido à espessura do corte. Como os magnetossomos têm em média 83 nm, isso significa que as suas cadeias podem estar inclinadas dentro do corte de 200 nm. Contudo essa inclinação não pode ser registrada no microscópio eletrônico de transmissão, pois os cortes são vistos de maneira bidimensional, achatados. Assim, as cadeias que estão inclinadas ao longo da espessura do corte são vistas no mesmo plano. A visão frontal vai mostrar os modelos na mesma direção em que os cortes foram vistos e registrados no microscópio eletrônico de transmissão, incluindo a posição das cadeias dos magnetossomos, de maneira bidimensional. A visão lateral mostra o modelo inclinado, o conjunto de informações dos cortes dando a informação tridimensional, com a limitação dos cortes de 200 nm. A descrição da posição das cadeias a nível celular fica prejudicada com os cortes espessos, mas o modelo maior mostra a posição das cadeias no microrganismo como um todo. Foram feitos oito modelos tridimensionais de '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' diferentes. O modelo tridimensional mostrado na figura 21 representa cerca de 75% de um microrganismo inteiro. O mesmo modelo é visto de frente (Figuras 21A e 21B) e lateralmente (Figuras 21C e D). Nas figuras 21A e 21C, o contorno do microrganismo está presente, assim como os magnetossomos. Nas figuras 21B e 21D, somente os magnetossomos estão presentes para facilitar a visualização. As cadeias de magnetossomos estão presentes em todas as camadas do microrganismo representadas (Figuras 21C e 21D). As cadeias formam grupos que muitas vezes estão paralelos entre si (Figuras 21A e 21B).

Nas figuras 22 e 23, dois microrganismos diferentes são representados em modelos tridimensionais. Na figura 22, o modelo representa 70% de um microrganismo inteiro, com o começo do microrganismo até um pouco além da metade. No modelo visto de frente (Figuras 22A e 22B), nota-se que não há cadeias no centro. Na vista lateral (Figuras 22C e

22D) pode-se observar que o início do modelo está praticamente destituído de magnetossomos. Esse início provavelmente representa algumas células do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ que parecem não ter magnetossomos. Essa distribuição é surpreendente, já que o resto do microrganismo representado tem magnetossomos distribuídos de modo uniforme, em grupos de cadeias na periferia do microrganismo. A maioria das cadeias parece estar paralela umas às outras, do mesmo modo que no modelo anterior (Figura 21).

O modelo da figura 23 mostra também uma distribuição assimétrica das cadeias no ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’. O modelo representa aproximadamente 70% de um microrganismo. Na vista frontal (Figuras 23A e 23B) o modelo tem um dos lados com uma quantidade visivelmente menor de magnetossomos que o outro. Na vista lateral (Figuras 23C e 23D), uma parte do modelo não tem magnetossomos, o que sugere que um grupo de células nesse microrganismo não tem magnetossomos. No resto do microrganismo, os magnetossomos estão organizados em cadeias e muitas cadeias estão paralelas entre si.

Mais três modelos menores foram feitos, e um deles, com cerca de 50% do microrganismo, tinha as cadeias uniformemente distribuídas. Os outros dois modelos, com cerca de 30% do microrganismo, a maioria das cadeias estava localizada em um dos lados dos modelos, no outro lado, as cadeias de magnetossomos eram praticamente ausentes (Dados não mostrados).

A distribuição dos magnetossomos quando ocorre a divisão do microrganismo ainda não é conhecida. Nas figuras 24 a 27, os cortes ultrafinos mostram diferentes etapas do ciclo biológico de diferentes ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’. Esses cortes foram feitos a partir do mesmo bloco no qual foram feitos os cortes seriados. Os cortes das figuras 24 a 26 não estavam achatados ou vibrados. Pode-se observar que os grânulos de

lipídios dos microrganismos permanecem circulares, o que indica que há muito pouca distorção da forma do microrganismo provocada por problemas na ultramicrotomia. O corte da figura 27 está vibrado, mas, mesmo com esse problema a imagem não parece estar distorcida, pois ainda mantém os grânulos de lipídeo circulares. A figura 24 mostra um corte um microrganismo esférico, com um compartimento interno pequeno, e provavelmente ainda não ocorreu a divisão das células. A figura 25 mostra de um microrganismo com um formato mais alongado, com um número maior de células e o compartimento interno também mais alongado, acompanhando a mudança de forma do microrganismo. Mesmo com esse formato diferente, as células ainda estão bem próximas, com o mesmo formato celular. Na figura 26 observa-se um microrganismo com o formato ainda mais alongado, nessa etapa o compartimento interno adquire um formato diferente e fica ainda maior, e as células têm uma área de contato muito maior com o compartimento interno que nas etapas anteriores. Mesmo nessa etapa da divisão do microrganismo, observam-se ainda células se dividindo. Na figura 27 observa-se um microrganismo com um formato diferente, em que as células parecem entrar no microrganismo. É difícil afirmar que essas células estão realmente penetrando no compartimento interno, porque esse é um corte isolado, podendo estar inclinado mostrando somente o topo de uma célula. Seria necessário fazer cortes seriados de microrganismo neste estágio do ciclo biológico para obter maiores informações. Contudo, formatos similares foram observados em microscopia ótica de campo claro com microrganismos vivos. Na figura 28 observam-se imagens em seqüência de um microrganismo com uma invaginação acentuada, provavelmente nos estágios finais da divisão. Os magnetossomos podem ser observados em ambos os lados do microrganismo, parecendo estar distribuídos de maneira uniforme. Na invaginação podem-se observar grupos de magnetossomos, que indicam que a parte superior das células se encontra naquela região. O inserto da figura 28 mostra um

microrganismo vivo corado com o corante de membrana fluorescente FM 1-43. Essa imagem mostra um microrganismo com uma disposição celular muito similar à da figura 27. As células próximas à invaginação parecem realmente estar entrando no compartimento interno. As imagens 27 e 28 sugerem que o compartimento interno é usado para a movimentação e organização das células na divisão.

A figura 29 mostra duas células em divisão, cada uma delas com alguns magnetossomos, confirmando que ambas células filhas conservam magnetossomos da célula original. A divisão acontece no eixo longo da célula, no sentido do ambiente externo para o compartimento interno. A figura 30 mostra 3 imagens em série de uma etapa da divisão do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’. A partir dessas imagens foi feito o modelo tridimensional (Figura 31) que tem o formato do microrganismo, as células, o compartimento interno e os magnetossomos representados. Algumas células ainda estão se dividindo e o compartimento interno tem um formato alongado. Os magnetossomos estão localizados na periferia das células, no entanto, a espessura do modelo não permite uma visualização da distribuição no microrganismo inteiro. Os magnetossomos estão presentes em todo o microrganismo, mostrando que a polaridade magnética é passada de geração em geração através da distribuição dos magnetossomos entre os microrganismos filhos no processo de divisão do microrganismo.

PRANCHA 01

Figura 08: Histograma do diâmetro médio dos magnetossomos do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' (n=746).

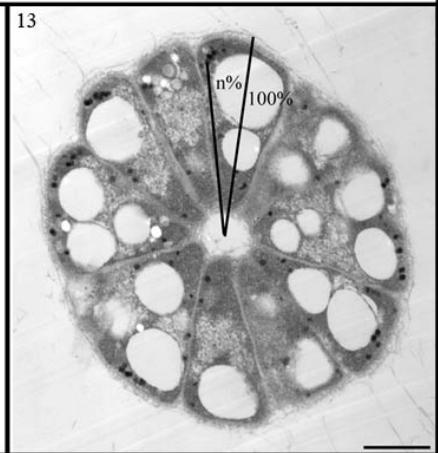
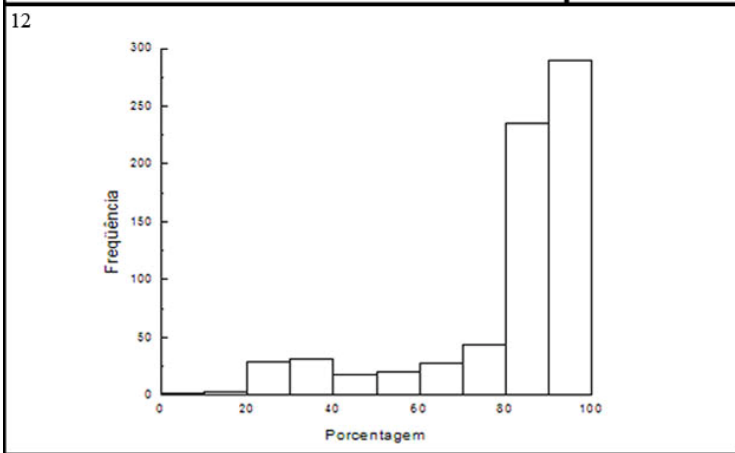
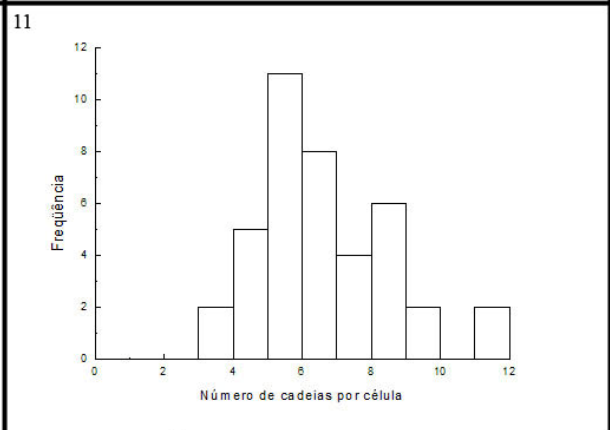
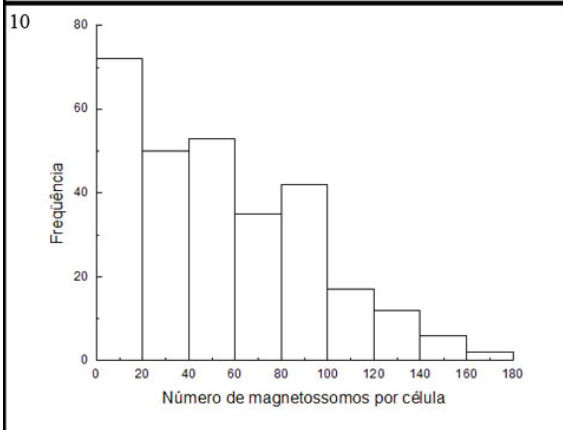
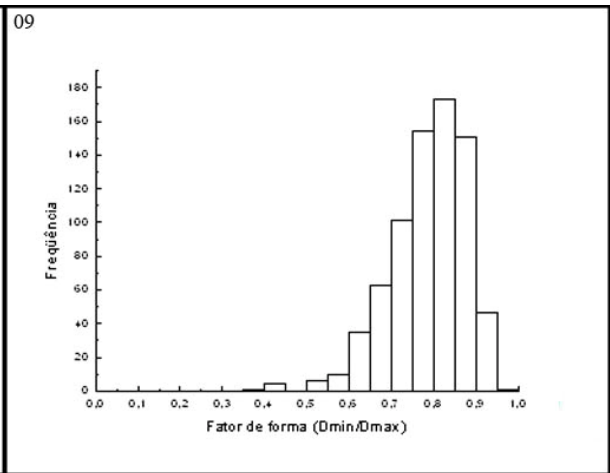
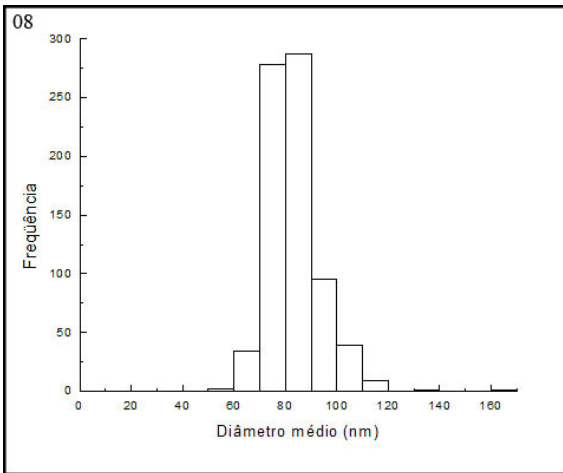
Figura 09: Histograma do fator de forma (diâmetro mínimo/diâmetro máximo) dos magnetossomos do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' (n=746).

Figura 10: Histograma do número de magnetossomos por célula do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' (n=289).

Figura 11: Histograma do número de cadeias de magnetossomos por célula do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' (n=40).

Figura 12: Histograma de frequência da porcentagem da distância do magnetossomo ao centro do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' com relação ao raio do microrganismo considerado 100% (n=696).

Figura 13: Corte ultrafino de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' mostrando um esquema da medida da distância do magnetossomo ao centro do microrganismo para obter a proporção de magnetossomos que se encontram na periferia da célula. A barra indica 1 μm .



PRANCHA 02

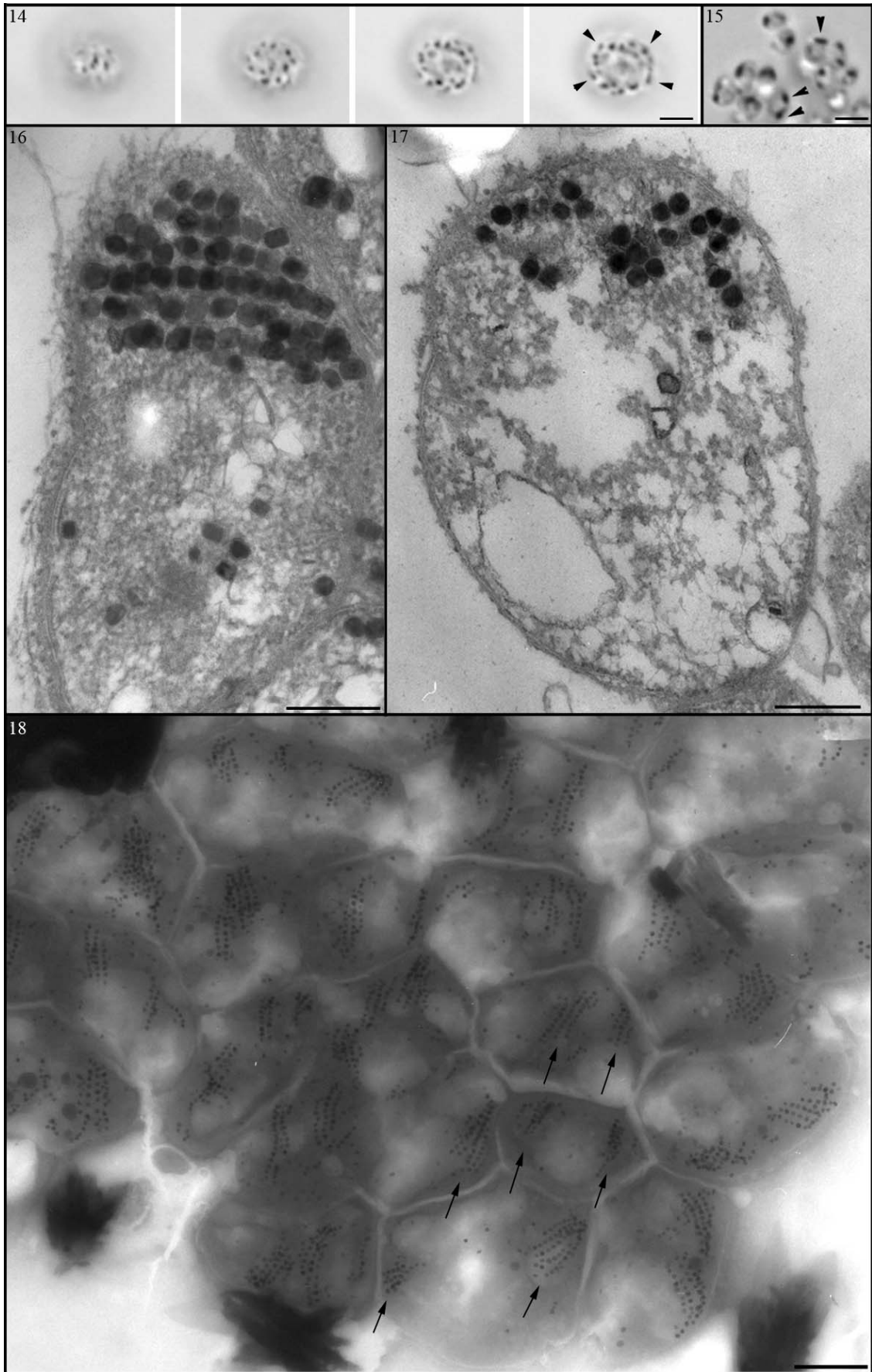
Figura 14: Série de imagens de microscopia óptica de campo claro em seqüência de foco de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' vivo. As cadeias dos magnetossomos (pontas de seta) encontram-se na periferia das células. A barra indica 5 μm .

Figura 15: Microscopia de campo claro de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' tratado com água destilada. As células estão desagregadas, com formato ovóide e as cadeias de magnetossomos (pontas de seta) parecem ainda se encontrar na periferia, e algumas células parecem ter mais de um grupo de cadeias de magnetossomos. A barra indica 2 μm .

Figura 16: Corte ultrafino de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' mostrando os magnetossomos organizados em diversas cadeias paralelas. A barra indica 300 nm.

Figura 17: Corte ultrafino de uma célula de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' tratado com água destilada. A célula está separada das outras e parece extraída. As cadeias estão desorganizadas. A barra indica 300nm.

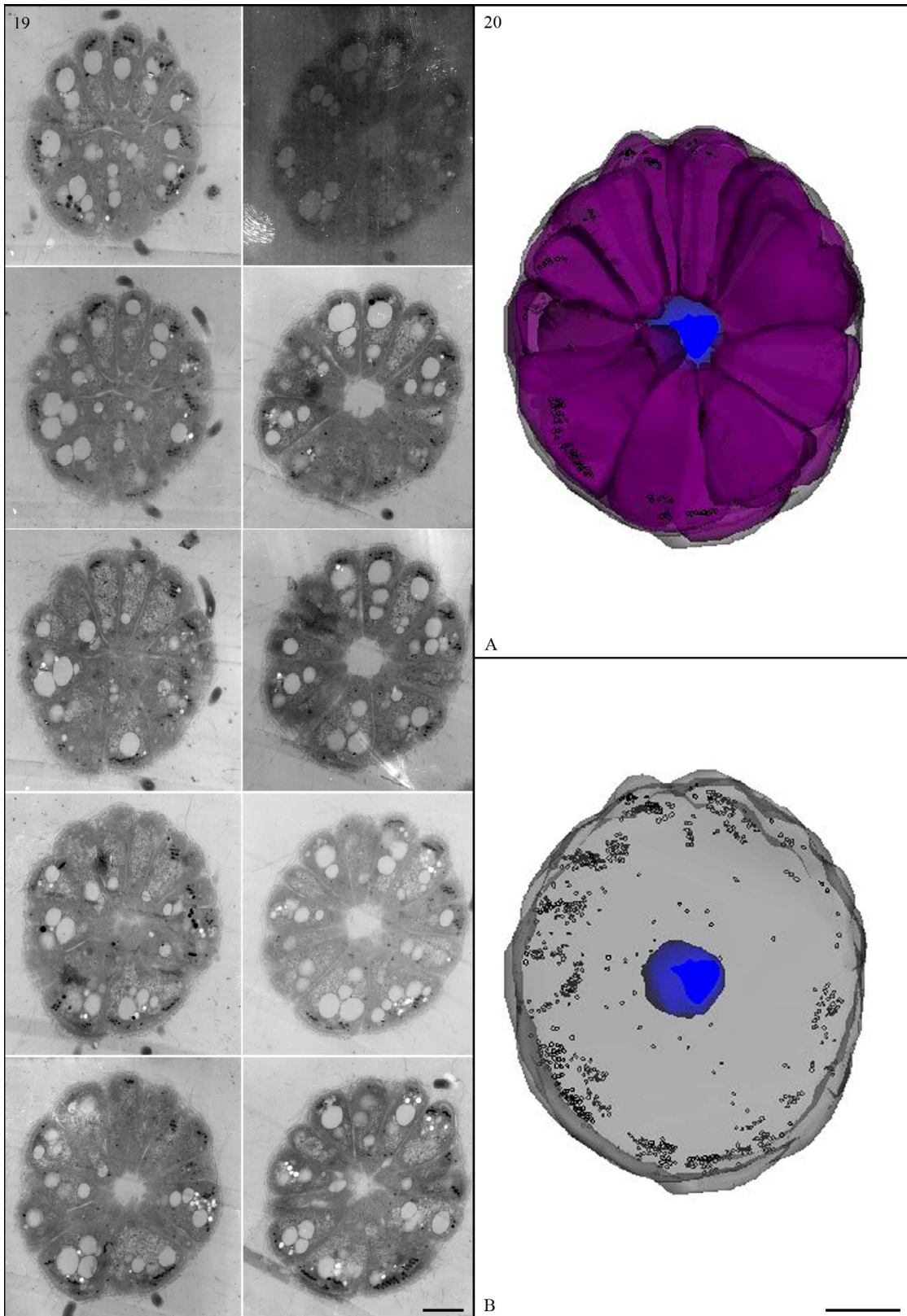
Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' sem contrastação negativa. Os magnetossomos estão organizados em cadeias nas células. O número de cadeias por célula é variado, no entanto todas as cadeias parecem estar alinhadas e organizadas em um ou mais grupos dentro das células (setas). A barra indica 1 μm .



PRANCHA 03

Figura 19: Cortes seriados ultrafinos de 90 nm de espessura nominal de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'. A barra indica 1 μm .

Figura 20: Vista frontal de um modelo tridimensional de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'. O modelo foi construído a partir dos cortes seriados da figura 19 e representa cerca de 1 μm do microrganismo. (A) O modelo representa o contorno do microrganismo em cinza, as células em roxo, o compartimento interno em azul e os magnetossomos em preto. (B) O mesmo modelo acima sem as células, para uma melhor visualização da distribuição dos magnetossomos. A barra indica 1 μm .



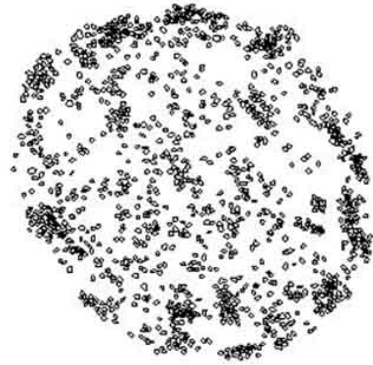
PRANCHA 04

Figura 21: Modelo tridimensional de um ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ construído a partir de cortes seriados de 200nm de espessura nominal. Vista frontal: (A) O modelo mostra em azul o volume celular e em preto estão os magnetossomos; (B) O modelo mostra somente os magnetossomos para facilitar a visualização da organização espacial. Os magnetossomos organizados em cadeias localizadas na periferia das células e parecem formar grupos que estão orientados em um eixo comum. Vista lateral: (C) O modelo mostra em azul o volume celular e em preto os magnetossomos, que parecem estar distribuídos de forma uniforme; (D) O modelo tem somente os magnetossomos. A barra indica 1 μm .

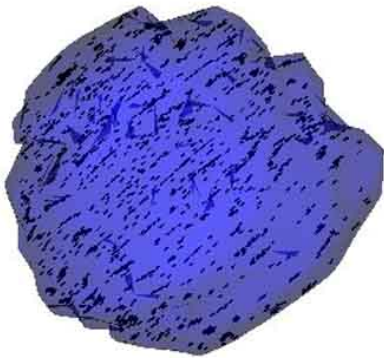
21



A



B



C



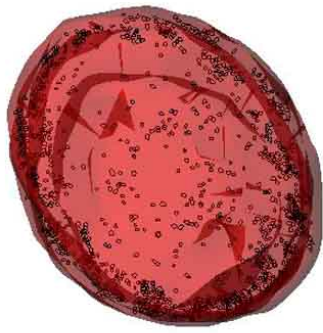
D

PRANCHA 05

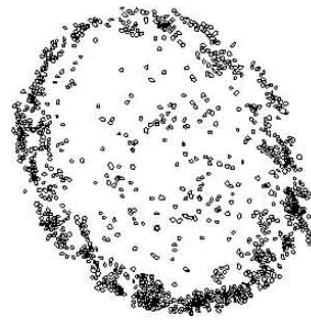
Figura 22: Modelo tridimensional de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' construído a partir de cortes seriados de 200 nm de espessura. O modelo representa um microrganismo desde o topo até um pouco além da metade dele. (A) e (C) Os modelos mostram em vermelho o volume celular, e os pontos pretos são os magnetossomos. (B) e (D) Os modelos mostram somente os magnetossomos para facilitar a visualização da organização espacial. (A) e (B) mostram uma vista frontal do modelo, que tem poucas cadeias no centro. (C) e (D) mostram vistas laterais, evidenciando que os magnetossomos estão praticamente ausentes do topo do modelo. A barra indica 1 μm .

Figura 23: Modelo tridimensional de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' construído a partir de cortes seriados de 200 nm de espessura. O modelo representa um microrganismo um pouco abaixo do topo até um pouco além da metade dele. (A) e (C) mostram em verde o volume celular, e os pontos pretos são os magnetossomos. (B) e (D) mostram somente os magnetossomos para facilitar a visualização da organização espacial. (A) e (B) mostram uma vista frontal do modelo, que tem um número menor de cadeias na lateral direita. (C) e (D) As vistas laterais dos modelos mostram que os magnetossomos estão ausentes na parte inferior. A barra indica 1 μm .

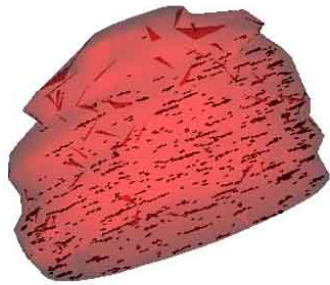
22



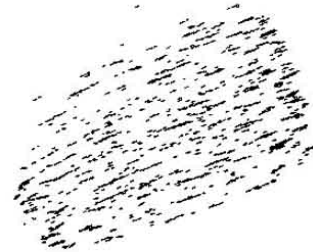
A



B

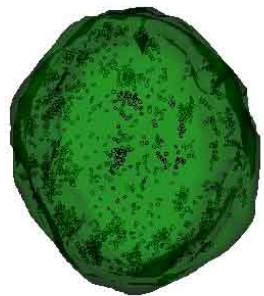


C

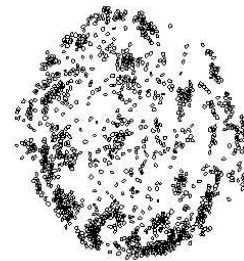


D

23



A



B



C



D

PRANCHA 06

Figura 24: Corte ultrafino de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' esférico, com número menor de células e com o compartimento interno pequeno e circular. A barra indica 1 μm .

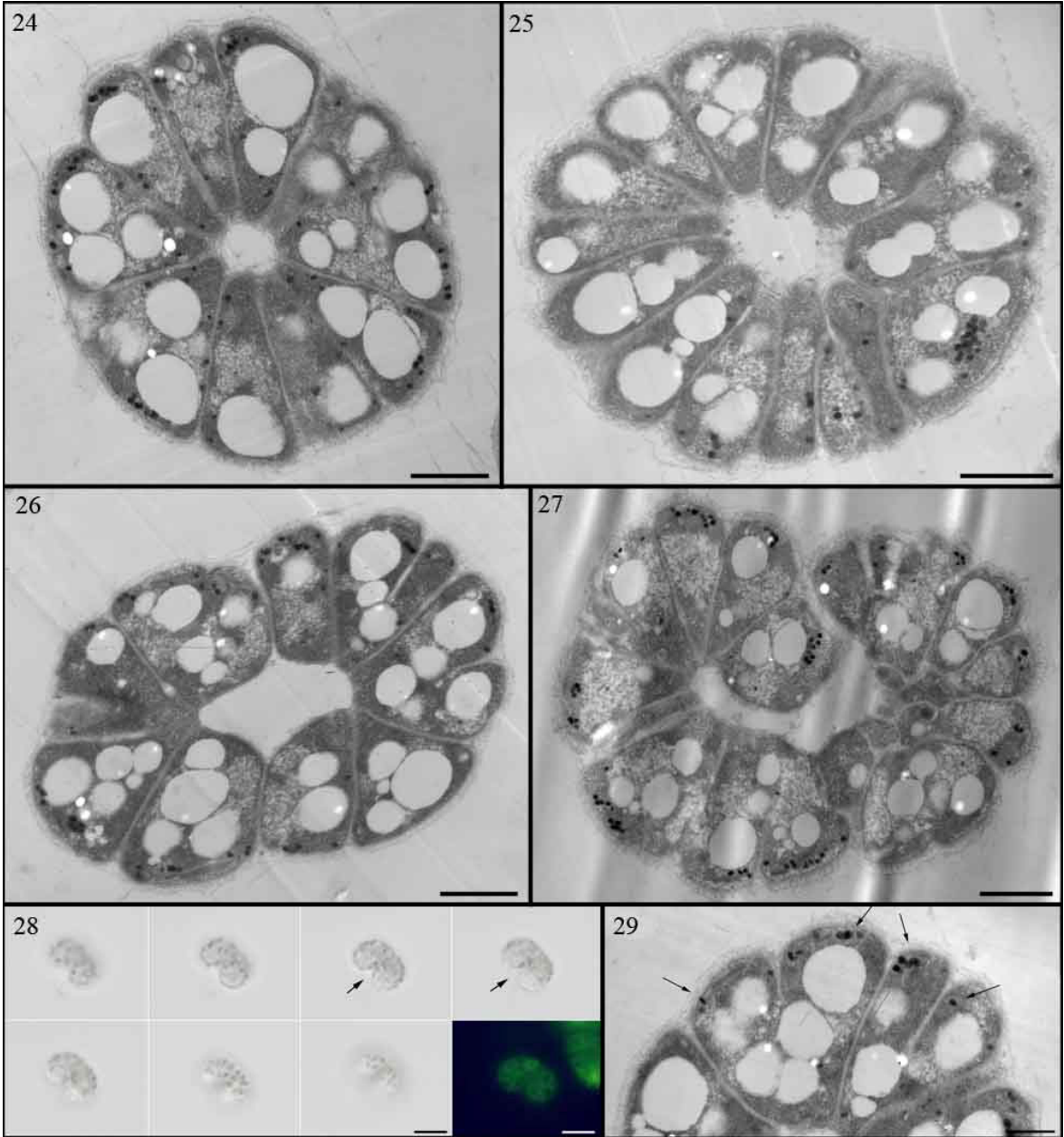
Figura 25: Corte ultrafino de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' mais alongado, com um número maior de células do que o corte da figura 24 e com o compartimento interno aumentado, acompanhando o formato do microrganismo. A barra indica 1 μm .

Figura 26: Corte ultrafino de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' ainda mais alongado, com o compartimento interno ocupando uma área maior. As células parecem ter um contato maior com o compartimento interno. Algumas células estão se dividindo. O microrganismo também parece estar se dividindo. A barra indica 1 μm .

Figura 27: Corte ultrafino de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' com uma distribuição celular atípica, onde parte das células parece estar entrando no compartimento interno, que por sua vez acompanha a disposição celular.

Figura 28: Serie de imagens de microscopia óptica de campo claro em seqüência de foco de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' vivo. O microrganismo está se dividindo, com uma entrada acentuada na lateral (setas). Os magnetossomos estão acompanhando a entrada lateral. Inseto: Microscopia de fluorescência de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' vivo corado com o corante de membrana FM 1-43. O formato das células do microrganismo pode ser observado na entrada lateral. As barras indicam 10 μm .

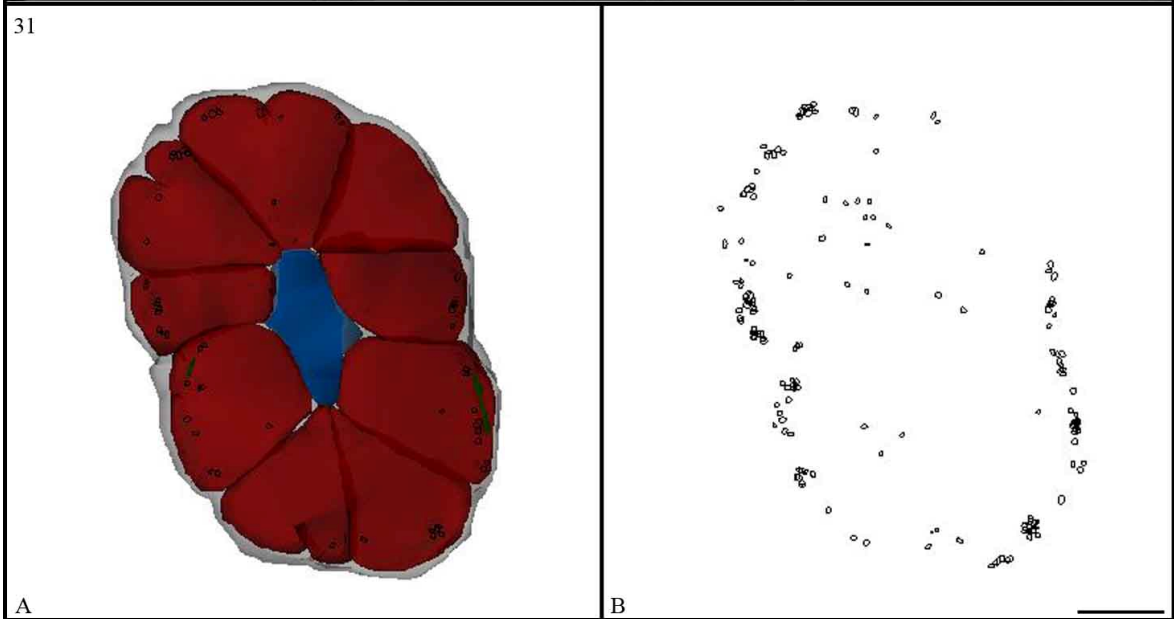
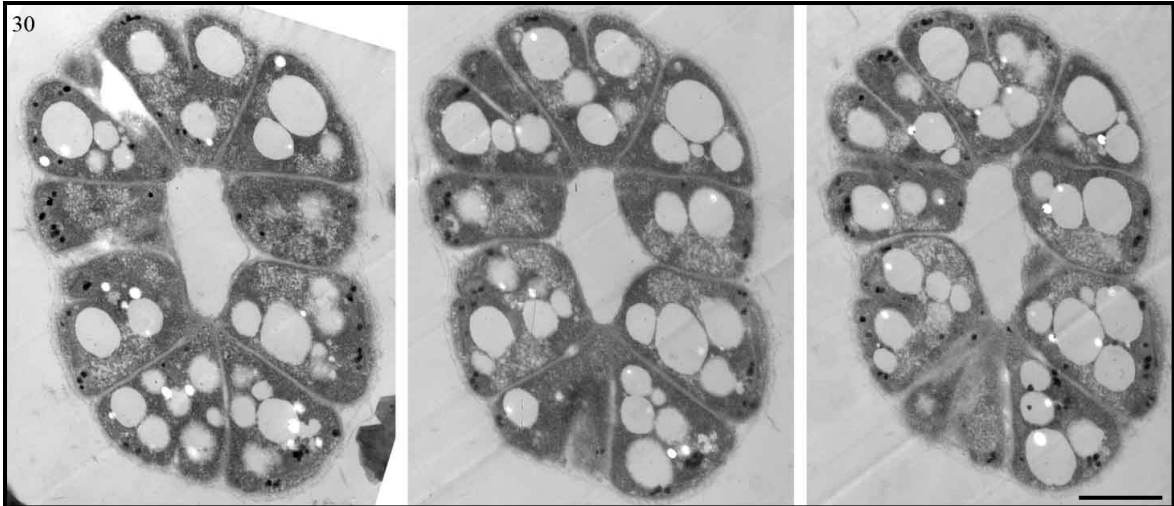
Figura 29: Corte ultrafino de duas células em divisão de um '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'. Os magnetossomos estão presentes nos dois lados da célula em divisão indicando que ambas células filhas recebem magnetossomos (setas). A barra indica 500 nm.



PRANCHA 07

Figura 30: Cortes ultrafinos em seqüência de um ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ em um estágio da divisão do microrganismo. A barra indica 1 μm .

Figura 31: Modelo tridimensional baseado nos cortes ultrafinos da figura 30. (A) O contorno celular está representado em cinza, as células em vermelho, o compartimento interno em azul, as estruturas estriadas em verde e os magnetossomos são os pontos pretos. (B) Modelo representando somente os magnetossomos, que parecem estar localizados somente na periferia da célula, mesmo durante a divisão. Os magnetossomos estão presentes nos dois lados do microrganismo, indicando que os microrganismos filhos vão herdar a polaridade do microrganismo original através dos magnetossomos. A barra indica 1 μm .



5. DISCUSSÃO

As bactérias têm importância fundamental na Terra. Elas têm funções essenciais em praticamente todos os processos bioquímicos na natureza. No entanto, apesar da importância desses microrganismos, ainda persiste a noção que as bactérias são simples microrganismos unicelulares. As bactérias formam comunidades complexas, com funções diferenciadas. E ainda, algumas delas têm um comportamento multicelular mais acentuado como as mixobactérias, que são bactérias sociais que se movimentam, se alimentam e desenvolvem corpos de frutificação em conjunto (Sozinova *et al.*, 2005). O ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ e as outras bactérias multicelulares magnetotáticas descritas têm muitas características de um microrganismo multicelular. O ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ tem uma organização celular definida incluindo estruturas especializadas com membrana, ele morre com a desagregação das células, que uma vez sozinhas também não são mais viáveis, suas células não parecem competir, eles apresentam magnetotaxia e suas células coordenam um movimento complexo de natação do microrganismo como um todo, e eles têm um ciclo biológico exclusivamente multicelular (Keim *et al.*, 2004a; 2004b).

As bactérias magnetotáticas unicelulares usam os magnetossomos para alinhá-las no campo magnético. A cadeia fornece um torque à célula, que a orienta no campo. O conceito do torque em uma célula é simples, porém, se essas células tivessem um formato diferenciado, não simétrico, e ainda estivessem arranjadas em um formato esférico, a compreensão de como o torque está agindo em todas as células para uma orientação eficiente é mais difícil. A magnetotaxia nos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ é eficiente (Winklhofer *et al.*, 2007). A organização dos magnetossomos nas células e ainda mais importante, a organização desses magnetossomos no microrganismo como um todo, é

uma questão fundamental para compreender a magnetotaxia no ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’.

O tamanho, o formato e a organização dos magnetossomos nas células do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ podem fornecer informações sobre a biomineralização dos cristais desse microrganismo. A distribuição de tamanho dos cristais pode ser usada para comparar populações diferentes de cristais de diferentes amostras e fornecer informações sobre o processo de nucleação e crescimento dos mesmos. O diâmetro médio com cerca de 83 nm dos cristais de greigita do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ é um pouco maior do que aqueles observados no MMA, com cerca de 70 nm (Farina et al. 1983), e no MMP, com cerca de 65 nm (Pósfai et al., 2001). Nos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ há um número pequeno de magnetossomos com diâmetro médio maior que 100 nm, podendo chegar até 160 nm. Nos MMPs não foram medidos magnetossomos de mais de 100 nm (Pósfai et al., 2001). Esses cristais grandes podem ser originados de defeitos na biomineralização, ou devido a um menor controle sobre o tamanho dos cristais pela célula. A distribuição de tamanho e do fator de forma dos magnetossomos de greigita do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ e do MMP são diferentes. Essa diferença entre os cristais de greigita em microrganismos tão semelhantes, pertencentes ao mesmo gênero, pode ser devido à influência de fatores ambientais sobre a biomineralização dos cristais.

Estudos anteriores mostram que a distribuição de tamanho de cristais de magnetita de bactérias magnetotáticas é estreita e o crescimento do cristal é interrompido em tamanhos maiores, mostrando o controle das bactérias magnetotáticas na biomineralização de magnetita (Devouard et al., 1998; Arató et al., 2005). Em ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ o controle da morfologia e do tamanho dos cristais de greigita não são tão restritos como em cristais de magnetita.

O MMP tem em média 481 magnetossomos (Simmons & Edwards, 2007). Um ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ tem em média 17,4 células (Keim *et al.*, 2004a), portanto se cada célula tem em média 52 magnetossomos, podemos dizer que cada microrganismo tem cerca de 900 magnetossomos. Essa diferença entre MMP e ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ pode acontecer devido a uma anomalia no campo magnético, chamada de anomalia do Atlântico Sul. O campo geomagnético é razoavelmente uniforme em configuração e intensidade sobre a Terra, com um valor de aproximadamente 0.5 Gauss (cerca de 20 vezes menos intenso que o gerado por um ímã de geladeira). No Rio de Janeiro, essa intensidade é ainda menor, com cerca de 0.2 Gauss. Devido a essa anomalia, os ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ podem produzir uma quantidade maior de magnetossomos que o MMP para compensar o campo magnético mais fraco. Inclusive, uma quantidade maior de magnetossomos também foi observada nos MMAs, também isolados no Rio de Janeiro, cerca de 1000 por microrganismo (Farina *et al.*, 1983). Contudo, o número superior de magnetossomos encontrado nos microrganismos da lagoa de Araruama em relação ao MMP pode ser resultado do crescimento do microrganismo em um ambiente ótimo, que leva ao crescimento rápido do microrganismo, e à biomineralização intensa dos cristais e por isso não é observado nenhum cristal de greigita nos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ abaixo de 50 nm.

A organização dos magnetossomos em cadeias é diferente entre as bactérias magnetotáticas. As cadeias podem estar isoladas, ou em grupos, cada cadeia pode ter um número diferente de magnetossomos, os magnetossomos podem estar muito próximos uns dos outros, ou com uma distância irregular (Komeili, 2007; Pósfai *et al.*, 2006). Independentemente da organização dos magnetossomos nas cadeias, elas fornecem o momento magnético necessário para a orientação da célula no campo magnético. As cadeias do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ são formadas em média por 9

magnetossomos, e elas formam grupos com cerca de 6 cadeias. No entanto, o número de magnetossomos por cadeia e o número de cadeias por célula tem uma variação significativa. Na organização de magnetossomos de magnetita, há uma variação em bactérias magnetotáticas de espécies diferentes, mas geralmente essa organização se mantém estável numa mesma espécie (Komeili, 2007). Kasama et al. (2006) mostrou em um bacilo produtor de magnetossomos de greigita, que as cadeias desses magnetossomos podem ter uma indução magnética mais irregular ao longo da cadeia que as cadeias de magnetossomos de magnetita, mas essas cadeias fornecem o momento magnético necessário para a orientação da bactéria magnetotática no campo magnético. Seria interessante fazer a análise de indução magnética nas cadeias de magnetossomos do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’.

As cadeias dos magnetossomos do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ estão localizadas na periferia da célula, perto da membrana em contato com o ambiente externo. A membrana que envolve os magnetossomos de magnetita de *Magnetospirillum* são originadas de invaginações da membrana citoplasmática. Algumas delas ainda estão ligadas à membrana, outras não (Komeili et al., 2006). Ainda não se sabe a origem da membrana nos magnetossomos de sulfeto de ferro, porém é razoável supor que elas também tenham origem na membrana citoplasmática. Os magnetossomos do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ também poderiam estar ligados à membrana, no entanto, devido a grande quantidade encontrada em cada célula do microrganismo seria difícil que todos eles estejam ligados em algum ponto da membrana. Uma vez formados os magnetossomos ou as vesículas, supõe-se que eles estariam ligados a algum tipo de estrutura como a estrutura filamentosa que mantém os magnetossomos de magnetita em cadeias (Komeili et al., 2006). Uma estrutura estriada já foi descrita na periferia das células do ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ (Silva et al., 2007), que poderia ter a

mesma função. A localização dessa estrutura condiz com a localização dos magnetossomos, e ela não foi observada em nenhum local a não ser na periferia da célula.

A posição periférica dos magnetossomos pode ter várias vantagens para a célula. O ferro para a biomineralização dos magnetossomos tem que ser transportado pela membrana na periferia do microrganismo, pois ela é a única com contato com o ambiente externo. Assim, a proximidade encurtaria a distância na qual o ferro teria que ser transportado para a biomineralização dos magnetossomos.

O momento magnético total do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' é dado pela soma vetorial dos momentos magnéticos de cada magnetossomo. Winklhofer et al. (2007) mostrou que esse microrganismo tem uma resposta magnética otimizada para uma dada organização dos magnetossomos. A maioria dos momentos magnéticos dos magnetossomos está alinhada. Em todos os modelos tridimensionais observou-se que grande parte das cadeias está paralela entre si. Se as diferentes cadeias no microrganismo estão paralelas entre si, a soma vetorial dos seus momentos magnéticos dá ao microrganismo um momento magnético total em uma direção comum que orienta o microrganismo no campo magnético. Algumas cadeias dos magnetossomos têm posições diferentes e os seus momentos magnéticos vão cancelar parte do momento magnético do microrganismo, mas parecem não interferir de modo efetivo na resposta magnética. O alinhamento das cadeias em diferentes células sugere uma complexidade ainda maior desse microrganismo. Como as células produzem o alinhamento dos magnetossomos em cada parte do microrganismo é um mistério. As células poderiam comunicar-se entre si ou as interações magnéticas entre as cadeias levariam ao alinhamento. Ainda não é possível determinar como essa organização acontece.

Em alguns microrganismos foram observadas assimetrias na distribuição dos magnetossomos. Partes deles não tinham cadeias de magnetossomos. Não sabemos o

porque dessa assimetria, mas ela está presente em diferentes microrganismos, afetando um grupo de células. Essas células podem ter alguma mutação que impede a biomineralização dos magnetossomos.

O compartimento interno parece ter uma função importante no microrganismo. No modelo com as células delineadas (ver figura 20), as células parecem se distribuir pelo espaço disponível no microrganismo. A organização das células parece ser mais rígida na proximidade com o compartimento interno. O compartimento interno e o contato entre as células parecem ter um papel fundamental na manutenção da coesão do microrganismo. Essa noção é reforçada pelas diferentes imagens de ultraestrutura do ciclo biológico do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' aqui apresentadas, que mostram que o formato do microrganismo e o compartimento interno passam por modificações semelhantes juntos. Ele parece ter uma função na organização celular dentro do microrganismo, principalmente na divisão. Sua posição no interior do microrganismo e o fato de ele não ter contato com o ambiente externo são vantajosos para manter coesão das células no microrganismo principalmente na divisão.

Foi observado que as células em divisão estão presentes em diferentes etapas da divisão do microrganismo. Isso sugere que a divisão das células pode não ocorrer de modo perfeitamente sincronizado. É uma observação importante que contraria a hipótese proposta por Keim et al. (2004b), que sugere que a divisão das células acontece sincronicamente antes da divisão do microrganismo. Provavelmente as duas etapas acontecem de maneira simultânea. As células do microrganismo aumentam de volume celular, e as células começam a se dividir, conseqüentemente o formato do microrganismo se modifica para acomodar o volume celular extra, aumentando o espaço no compartimento interno, que leva a divisão do microrganismo. Diversas imagens (ver figuras 27 e 28) mostram uma invaginação no que parece ser uma das etapas finais da

divisão do microrganismo. Essa reentrância no formato do microrganismo provavelmente acontece quando as células se movimentam para dentro do compartimento interno, de modo a rearranjar as células laterais para formar dois microrganismos esféricos. Esse rearranjo celular permite a formação de dois compartimentos internos separados que manterão a forma dos microrganismos filhos.

Kasama et al. (2006) mostraram que, na divisão celular de um bacilo produtor de magnetossomos de greigita, as cadeias de magnetossomos se estendem ao longo do eixo da célula, e parecem ser divididas igualmente nas células filhas quando se separam. Os nossos resultados mostraram que os magnetossomos do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' se dividem entre as células-filhas e microrganismos-filhos na divisão. Abreu et al. (2007) mostrou por citometria de fluxo que há duas populações de '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'. Uma delas é composta de microrganismos menores, com menos grânulos, que poderiam representar microrganismos recentemente divididos. A outra população têm microrganismos maiores, com maior quantidade de grânulos e magnetossomos, representando microrganismos se dividindo. E nessa divisão, de acordo com esses resultados e os nossos, os microrganismos filhos terão magnetossomos do microrganismo original, herdando a polaridade magnética, como os outros microrganismos magnetotáticos.

Os magnetossomos estão presentes em maior quantidade nas células do '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' do que em MMPs. Eles apresentam diferenças também em relação ao tamanho e à forma dos cristais, o que pode acontecer devido ao fato de serem espécies diferentes ou devido a influência de ambientes de crescimento diferentes. Os resultados mostram que o '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' tem controle sobre a distribuição dos magnetossomos durante o seu ciclo biológico e isso permite que ele tenha uma reposta magnetotática otimizada. O seu ciclo biológico permite que ele

mantenha a polaridade magnética após a divisão. Ainda é necessário fazer um modelo tridimensional mais detalhado dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’, provavelmente por tomografia eletrônica devido ao seu tamanho, para acompanhar a distribuição das células e dos magnetossomos e caracterizar de forma mais profunda a organização das células e dos magnetossomos na divisão, de modo a compreender melhor o ciclo biológico multicelular dos ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ e a transmissão da magnetotaxia de geração em geração.

6. BIBLIOGRAFIA

ABREU, F., SILVA, K.T., MARTINS, J.L., LINS, U. 2006. Cell viability in magnetotactic multicellular prokaryotes. *Int. Microbiol.*, **9**:267-272.

ABREU, F., MARTINS, J.L., SILVEIRA, T.S., KEIM, C.N., LINS DE BARROS, H.G.P., GUEIROS-FILHO, F.J. & LINS, U. 2007. '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**:1318-1322.

ARAKAKI, A., WEBB, J. & MATSUNAGA, T. 2003. A novel protein tightly bound to bacterial magnetite particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.*, **278**:8745-8750.

ARATÓ, B., SZÁNYI, Z., FLIES, C., SCHÜLER, D., FRANKEL, R.B., BUSECK, P.R., PÓSFAL, M. 2005. Crystal-size and shape distribution of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as potential biomarker. *Am. Mineral.*, **90**:1233-1241.

BAZYLINSKI, D.A., FRANKEL, R.B. & JANNASCH, H.W. 1988. Anaerobic magnetite production by a marine, magnetotactic bacterium. *Nature*, **334**:518-519.

BAZYLINSKI, D.A., GARRAT-REED, A.J., ABEDI, A. & FRANKEL, R.B. 1993a. Copper association with iron sulfide magnetosomes in a magnetotactic bacterium. *Arch. Microbiol.*, **160**:35-42.

BAZYLINSKI, D.A., HEYWOOD, B.R., MANN, S. & FRANKEL, R.B. 1993b. Fe_3O_4 and Fe_3S_4 in a bacterium. *Nature*, **366**:218.

BAZYLINSKI, D.A., FRANKEL, R.B., HEYWOOD, B.R., MANN S., KING, J.W., DONAGHAY P.L. & HANSON, A.K. 1995. Controlled biomineralization of magnetite (Fe_3O_4) and greigite (Fe_3S_4) in a magnetotactic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**:3232-3239.

BAZYLINSKI, D.A. & FRANKEL, R.B. 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Rev.*, **2**:217-230.

BAZYLINSKI, D.A. & WILLIAMS, T.J. 2006. Ecophysiology of magnetotactic bacteria. Ed. D. Schüler, *Microbiology Monographs* (3) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 37-76.

BLAKEMORE, R. 1975. Magnetotactic bacteria. *Science*, **190**:377-379.

BLAKEMORE, R., FRANKEL, R.B. & KALMIJN, J. 1980. South-seeking magnetotactic bacteria in the Southern Hemisphere. *Nature*, **286**:384-385.

BLAKEMORE, R.P. 1982. Magnetotactic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **36**:217-238.

BURGESS, J.G., KAWAGUCHI, R., SAKAGUCHI, T., THORNHILL, R.H. & MATSUNAGA, T. 1993. Evolutionary relationships among *Magnetospirillum* strain inferred from phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences. *J. Bacteriol.*, **175**:6689-6694.

CLEMETT, S.J., THOMAS-KEPRTA, K.L., SHIMMIN, J., MORPHEW, M., MCINTOSH, J.R., BAZYLINSKI, D.A., KIRSCHVINK, J.L., WENTWORTH, S.J., MCKAY, D.S. & VALI, H. 2002. Crystal morphology of MV-1 magnetite. *Am. Mineral.*, **87**:1727-1730.

DEAN, A.J. & BAZYLINSKI, D.A. 1999. Genome analysis of several marine, magnetotactic bacterial strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Current Microbiol.*, **39**:219-225.

DELONG, E.F., FRANKEL, R.B. & BAZYLINSKI, D.A. 1993. Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria. *Science*, **259**:803-806.

DEVOUARD, B., PÓSFAL, M., HUA, X., BAZYLINSKI, D.A., FRANKEL, R.B. & BUSECK, P.R. 1998. Magnetite from magnetotactic bacteria: size distribution and twinning. *Am. Mineral.*, **83**:1387-1398.

- FASSBINDER, J.W.E., STANJEK, H. & VALI, H. 1990. Occurrence of magnetic bacteria in soil. *Nature*, **343**:161-162.
- FARINA, M., LINS DE BARROS, H, ESQUIVEL, D.M.S. & DANON, J. 1983. Ultrastructure of a magnetotactic microorganism. *Biol. Cell*, **48**:85-88.
- FIALA, J.C. 2005. *Reconstruct*: a free editor for serial section microscopy. *J. Microsc.*, **218**:52-61.
- FRANKEL, R.B. 1984. Magnetic guidance of organisms. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **13**: 85-103.
- FRANKEL, R.B., BAZYLINSKI, D.A., JOHNSON, M.S. & TAYLOR, B.L. 1997. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys. J.*, **73**:994-1000.
- GREENBERG, M.; CANTER, C.; MAHLER, I. & TORNHEIM, A. 2005. Observation of magnetoreceptive behavior in a multicellular magnetotactic prokaryote in higher than geomagnetic fields. *Biophys. J.*, **88**:1496-1499.
- GRÜNBERG, K., MÜLLER, E.C., OTTO, A., RESZKA, R., LINDER, D., KUBE, M., REINHARDT, R. & SCHÜLER, D. 2004. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**:1040-1050.
- HANZLIK, M., WINKLHOFER, M. & PETERSEN, N. 1996. Spatial arrangement of chains of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **145**:125-134.
- HANZLIK, M., WINKLHOFER, M. & PETERSEN, N. 2002. Pulse-field-remanence measurements on individual magnetotactic bacteria. *J. Magnet. Mag. Mater.*, **248**:258-267.
- KASAMA, T., PÓSFAL, M., CHONG, R.K.K., FINLAYSON, A.P., BUSECK, P.R., FRANKEL, R.B. & DUNIN-BORKOWOSKI, R.E. 2006. Magnetic properties, microstructure, composition, and morphology of greigite nanocrystals in magnetotactic bacteria from electron holography and tomography. *Am. Mineral.*, **91**:1216-1229.

KAWAGUCHI, R., BURGESS, J.G., SAKAGUCHI, T., TAKEYAMA, H., THORNHILL, R.H. & MATSUNAGA, T. 1995. Phylogenetic analysis of a novel sulfate-reducing magnetic bacterium, RS-1, demonstrates its membership of the δ - Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **126**:277-282.

KEIM, C. N., ABREU, F., LINS, U., BARROS, H. G. L. & FARINA, M. 2004a. Cell organization and ultrastructure of a magnetotactic multicellular organism. *J. Struct. Biol.*, **145**:254–262.

KEIM, C. N., MARTINS, J.L, ABREU, F., ROSADO, A.S., LINS DE BARROS, H.P., BOROJEVIC, R., LINS, U. & FARINA, M. 2004b. Multicellular life cycle of magnetotactic prokaryotes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **240**:203-208.

KEIM, C.N., MARTINS, J.L., LINS DE BARROS, H.P., LINS, U. & FARINA, M. 2007. Structure, behavior, ecology and diversity of multicellular magnetotactic prokaryotes in *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*. Ed. D. Schüler, *Microbiology Monographs* (3) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 103-132.

KOBAYASHI, A., KIRSCHVINK, J.L., NASH, C.Z., KOOP, R.E., SAUER, D.A., BERTANI, L.E., VOORHOUT, W.F. & TAGUCHI, T. 2006. Experimental observation of magnetosome chain collapse in magnetotactic bacteria: Sedimentological, paleomagnetic, and evolutionary implications. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **245**:538-550.

KOMEILI, A., VALI, H., BEVERIDGE, T.J. & NEWMAN, D.K. 2004. Magnetosomes vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation. *PNAS*, **101**:3839-3844.

KOMEILI, A., LI, Z., NEWMANN, D.K. & JENSEN, G.J. 2006. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by actin-like protein MamK. *Science*, **311**:242-245.

KOMEILI, A. 2007. Molecular mechanisms of magnetosome formation. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**:351-366.

LINS, U. & FARINA, M. 1999. Organization of cells in magnetotactic multicellular aggregates. *Microbiol. Res.*, **154**: 9-13.

LINS, U., FREITAS, F., KEIM, C.N., LINS DE BARROS, H.G.P., ESQUIVEL, D.M.S & FARINA, M. 2003. Simple homemade apparatus for harvesting uncultured magnetotactic microorganisms. *Braz. J. Microbiol.*, **34**:11-116.

LINS, U., KEIM, C.N., EVANS, F.F., FARINA, M. & BUSECK, P.R. 2007. Magnetite (Fe_3O_4) and greigite (Fe_3S_4) crystals in multicellular magnetotactic prokaryotes. *Geomicrobiol. J.*, **24**:43-50.

LOWENSTAM, H.A. & WEINER, S. 1989. *On Biomineralization*, New York, Oxford University Press.

MANN, S., SPARKS, N.H.C., FRANKEL, R.B., BAZYLINSKI, D.A. & JANNASCH, H.W. 1990. Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe_3S_4) and iron pyrite (FeS_2) in a magnetotactic bacterium. *Nature*, **343**:258-261.

MELDRUM, F.C., HEYWOOD, B.R., MANN, S., FRANKEL, R.B. & BAZYLINSKI, D.A. 1993a. Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium. *Proc. R. Soc. London*, **251**:231-236.

MELDRUM, F.C., HEYWOOD, B.R., MANN, S., FRANKEL, R.B. & BAZYLINSKI, D.A. 1993b. Electron microscopy study of magnetosomes in two cultured vibroid magnetotactic bacteria. *Proc. R. Soc. London*, **251**:237-242.

PÓSFAL, M., BUSECK, P.R., BAZYLINSKI, D.A. & FRANKEL, R.B. 1998a. Reaction sequence of iron sulfide minerals in bacteria and their use as biomarkers. *Science*, **280**:880-883.

PÓSFAL, M., BUSECK, P.R., BAZYLINSKI, D.A. & FRANKEL, R.B. 1998b. Iron sulfides from magnetotactic bacteria: structure, composition, and phase transitions. *Am. Mineral.*, **83**:1469-1481.

PÓSFAL, M., CZINER, K., MÁRTON, E., MÁRTON, P., BUSECK, P.R., FRANKEL, R. B., BAZYLINSKI, D.A. 2001. Crystal-size distribution and possible biogenic origin of Fe sulfides. *Eur. J. Mineral.*, **13**:691-703.

PÓSFAL, M., MOSKOWITZ, B.M., ARATÓ, B., SCHÜLER, D., FLIES, C., BAZYLINSKI, D.A. & FRANKEL, R.B. 2006. Properties of intracellular magnetite crystals produced by *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **249**:444-455.

RICHTER, M., KUBE, M., BAZYLINSKI, D.A., LOMBARDOT, T., GLÖCKNER, F.O., REINHARDT, R. & SCHÜLER, D. 2007. Comparative genoma analysis of four magnetotactic bacteria reveals a complex set of group-specific genes implicated in magnetosome biomineralization and function. *J. Bacteriol.*, **149**:4899-4910.

RODGERS, F.G., BLAKEMORE, R.P., BLAKEMORE, N.A., FRANKEL, R.B., BAZYLINSKI, D.A., MARATEA, D. & RODGERS, N. 1990. Intercellular structure in a many-celled magnetotactic prokaryote. *Arch. Microbiol.*, **154**:18-22.

SAKAGUCHI, T., BURGESS, J.G. & MATSUNAGA, T. 1993. Magnetite formation by a sulphate-reducing bacterium. *Nature*, **365**: 47-49.

SAKAGUCHI, T., ARAKAKI, A. & MATSUNAGA, T. 2002. *Desulfovibrio magneticus* sp.nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain magnetite particles. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **52**:215-221.

SCHEFFEL, A., GRUSKA, M., DAMIEN, F., LINAROUDIS, A., PLITZKO, J.M. & SCHÜLER, D. 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature*, **440**:110-114.

SCHÜLER, D. & FRANKEL, R. B. 1999. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**:464-473.

SILVA, K.T., ABREU, F., ALMEIDA, F.P., KEIM, C.N., FARINA, M. & LINS, U. 2007. Flagellar Apparatus of South-Seeking Many-Celled Magnetotactic Prokaryotes. *Microsc. Resear. Tech.*, **70**:10-17.

SIMMONS, S.L., SIEVERT, S.M., FRANKEL, R.B., BAZYLINSKI, D.A. & EDWARDS, K.J. 2004. Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**:6230-6239.

SIMMONS, S.L. & EDWARDS, K.J. 2007. Unexpected diversity in populations of the many-celled magnetotactic prokaryote. *Environ. Microbiol.*, **9**:206-215.

SOZINOVA, O., JIANG, Y., KAISER, D., ALBER, M. A three-dimensional model of myxobacterial aggregation by contact-mediated interactions. *PNAS*, **102**:11308-11312.

SPARKS, N.H.C., MANN, S., BAZYLINSKI, D.A., LOVLEY, D.R., JANNASCH, H.W. & FRANKEL, R.B. 1990. Structure and morphology of magnetite anaerobically-produced by a marine magnetotactic bacterium and a dissimilatory iron-reducing bacterium. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **98**:14-22.

SPRING, S., AMANN, R., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H., GEMERDEN, H. VAN & PETERSEN, N. 1993. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of freshwater sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**:2397-2403.

SPRING, S. & BAZYLINSKI, D.A. 2000. Magnetotactic bacteria. In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. M. Dworkin et al. (eds.), 3rd edition, New York, Springer-Verlag, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.

TANAKA, M., OKAMURA, Y., ARAKAKI, A., TANAKA, T., TAKEYAMA, H., MATSUNAGA, T. 2006. Origin of magnetosome membrane: proteomic analysis of magnetosome membrane and comparison with cytoplasmic membrane. *Proteomics*, **6**:5234-5247.

TOWE, K.M, & MOENCH. T.T. 1981. Electron-optical characterization of bacterial magnetite. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **52**:213-220.

VALI, H., FÖSTER, O., AMARATIDIS, G. & PETERSEN, N. 1987. Magnetotactic bacteria and their magnetofossils in sediments. *Earth Planet. Sci.Lett.*, **86**:389-426.

WINKLHOLFER, M., ABRAÇADO, L.G., DAVILA, A.F., KEIM, C.N., LINS DE BARROS, H.G.P. 2007. Magnetic optimization in a multicellular magnetotactic organism. *Biophys. J.*, **92**:661-670.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)