

Júlia Peixoto de Albuquerque

Caracterização morfológica e distribuição populacional de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre do gênero *Beggiatoa*



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Dr. Ulysses Garcia Casado Lins



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

de Albuquerque, Júlia Peixoto

Caracterização morfológica e distribuição populacional de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre do gênero *Beggiatoa*/Júlia Peixoto de Albuquerque – Rio de Janeiro, 2009

xiv, 95

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof.

Paulo de Góes, 2009.

Orientador: Dr. Ulysses Lins

Referências bibliográficas: f 89

1. Bactérias filamentosas 2. *Beggiatoa* 3. Hipersalino 4. Morfologia 5. Ultraestrutura 6. Deslizamento I. Lins Ulysses. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências Biológicas. III. Caracterização morfológica e análise populacional de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre do gênero *Beggiatoa*



# UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes

Coordenação de Pós-graduação

## ATA DA DEFESA DE TESE PARA A CONCESSÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (MICROBIOLOGIA)

REALIZADA EM: 15 de Dezembro de 2009.

CANDIDATA: JULIA PEIXOTO DE ALBUQUERQUE

BANCA EXAMINADORA: Prof. Lucy Seldin (Presidente da Banca)  
Prof. Ulysses Garcia Casado Lins  
Prof. Kildare Rocha de Miranda  
Prof. Márcia Attias  
Prof. Alexandre Soares Rosado (Revisor)

TÍTULO DA TESE: "Caracterização Morfológica e Análise Populacional de Bactérias oxidantes de Enxofre dos Gêneros *Beggiatoa* e *Thiovulum*".

LOCAL: Anfiteatro do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ

HORA DE INÍCIO: 09:00 horas

Em sessão pública, após a exposição de cerca de 60 minutos, a candidata foi argüida oralmente, pelos membros da banca, tendo demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização no tema de sua tese, "**Caracterização Morfológica e Análise Populacional de Bactérias oxidantes de Enxofre dos Gêneros *Beggiatoa* e *Thiovulum***", sendo aprovada por unanimidade pelos membros da banca que conferiram os seguintes graus:

Prof. Lucy Seldin (Presidente da Banca)  
Prof. Ulysses Garcia Casado Lins  
Prof. Kildare Rocha de Miranda  
Prof. Márcia Attias  
Prof. Alexandre Soares Rosado (Revisor)

Grau...	9.0	Conceito...	A
Grau...	9.0	Conceito...	A
Grau...	9.0	Conceito...	A
Grau...	9.0	Conceito...	A
Grau...	9.0	Conceito...	A
Grau final...	9.0	Conceito final...	A

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca, e pela candidata.

Rio de Janeiro, 15 de Dezembro de 2009.

Orientador:   
Prof. Ulysses Garcia Casado Lins

Prof. Lucy Seldin  
(Presidente da Banca)

Prof. Kildare Rocha de Miranda

Prof. Ulysses Garcia Casado Lins

Prof. Márcia Attias

Prof. Alexandre Soares Rosado (Revisor)

Coordenadora:   
Prof. Ana Paula Vieira Colombo

Candidata:   
Julia Peixoto de Albuquerque

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia e Ultraestrutura de Procariotos, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Prof. Ulysses Garcia Casado Lins

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus! É por Ele que estou aqui e para servi-Lo!!!

Meus pais queridos, Claudionor e Esther, muito obrigada! Vocês não só me “colocaram no mundo” como me lembram, a cada dia, que eu tenho o meu lugar!!!

Ao meu namorado, Fábio, por TUDO, literalmente! Por todo o amor que recebo, a cada dia, por estar ao meu lado em TODOS os momentos!!! Obrigada, meu amor, por estar comigo, desde já, “na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, na riqueza e na pobreza,...” e transformar todos os dias, sempre, em dias MARAVILHOSOS!!! AAAAAAAAAMOOOOOOO muito tudo isso!!!!!!!

À toda a minha família, minha irmã Sara, meu sobrinho Gabriel, que está no céu, minhas avós Nara e Ivete, todos os meus tios e primos, a quem eu amo tanto!!! Obrigada por existirem e serem parte tão grande da minha vida!!!

À minha afilhada e sobrinha Beatriz... Por toda a alegria que me dá com sua energia sem fim!!! E aos meus cunhados, Cris e Felipe, pelo presente!!!

Ao Freüd, meu cachorro! Com certeza ele é quem está SEMPRE ao meu lado!!! Fiel companheiro e seguidor!!! Amo-te, cão!!!

Ao Prof. Ulysses Lins, por ter me aceitado no laboratório e ter me orientado, muito obrigada!

A todos os colegas de laboratório, aos que estão por lá e aos que já tomaram outro rumo... Valeu, galera, por tudo!!!

Em especial às queridas amigas Fernanda e Thaís, por serem MUITO mais do que colegas de trabalho!!! Muito obrigada pela amizade e carinho que, tenho certeza, durarão muitos anos mais!!!!!!

À Prof. Thaís Souto-Padrón e suas alunas, obrigada por toda a ajuda e presteza, sempre que solicitadas!!!!

Às meninas do “Clube da Luluzinha”, Juliana, Carol, Aline e Cláudia, obrigada pelos chopps, churrascos e ouvidos!

Às minhas queridas amigas Marcinha, El, Iba e Quel... Sem comentários!!! AMO!!! MEGA obrigada, SEMPRE!!!!

Ao Laboratório de Genética Microbiana, principalmente à Prof. Lucy e à Janaína Marculina, MUITO OBRIGADA por tudo!!! Sempre me ajudando com os equipamentos e tudo o mais que eu precisasse...

À minha família querida do coração, meus amigos de vida e estrada... MUITO OBRIGADA!!! Por toda a nossa caminhada, sempre se ajudando, se amando, compartilhando tudo!!! Que Deus nos proporcione ainda muitos dias de terço e novena!!!

À Giuliana, Debora, Verônica (e Henrique) e Fabíola (e Beatriz), MUITO OBRIGADA por fazerem parte de tudo, tudo MESMO!!! A.M.I.G.A.S

Aos meus queridinhos, Rosy e Wellington, muito é pouco pra expressar!!! Amo vocês!!!

À COPPE, pela utilização do microscópio JEOL 2000 FX, principalmente à Carla Woyames Gabriel, por toda a ajuda com o equipamento.

Ao laboratório Hertha-Meyer, na pessoa do Dr. Wanderley de Souza, pela utilização do microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX e do microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310.

À pós-graduação, na pessoa da Dr. Ana Paula Vieira Colombo.

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, na pessoa da diretora Dr. Agnes Marie Sá Figueiredo.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

À UFRJ, na pessoa do Reitor Prof. Aloísio Teixeira.

## RESUMO

Júlia Peixoto de Albuquerque

Caracterização morfológica e distribuição populacional de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre do gênero *Beggiatoa*

Orientador: Ulysses Garcia Casado Lins

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Bactérias filamentosas deslizantes oxidantes de enxofre do gênero *Beggiatoa* estão amplamente distribuídas em ambientes onde são observados níveis detectáveis de sulfeto de hidrogênio. O principal critério para classificar um microrganismo como pertencente ao gênero *Beggiatoa* é sua morfologia, sendo considerado único cada tricoma deslizante contendo glóbulos de enxofre característicos. *Beggiatoa* cora como Gram negativa, mas a estrutura de seu envelope celular é mais complexa que de uma bactéria Gram-negativa típica. Aqui, nós pretendemos investigar se *Beggiatoa* vacuoladas e não-vacuoladas diferem tanto morfológicamente, quanto filogeneticamente. Desta forma, nós avaliamos e diferenciamos, baseados em microscopia de luz, microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica, a estrutura e a motilidade de bactérias filamentosas estreitas e largas com características morfológicas de *Beggiatoa*, nas Lagoas de Araruama e Itaipu; uma lagoa permanentemente e moderadamente hipersalina e um ambiente marinho, respectivamente, ambas localizadas nas costa leste do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Nós também confirmamos a identidade dos filamentos estreitos como pertencentes ao gênero *Beggiatoa* através do seqüenciamento do gene *rrs* e analisamos a distribuição das populações de *Beggiatoa* da Lagoa de Araruama na coluna d'água e no sedimento. As células procarióticas formam tricomas com diâmetros médios de 4,46  $\mu\text{m}$  (estrito) e 13,54  $\mu\text{m}$  (largo), e comprimento de 10  $\mu\text{m}$  a mais de 150  $\mu\text{m}$  e 30 mm, respectivamente. Observamos diferenças estruturais relacionadas ao envelope celular dos tricomas. O envelope celular de *Beggiatoa* estreita consiste em cinco camadas, enquanto o envelope dos tricomas largos possui quatro camadas. O movimento de deslizamento parece ocorrer como descrito para cianobactérias deslizantes, pois encontramos estruturas fibrilares na superfície dos tricomas; a trilha do polímero é formada a partir da região do septo e parece haver um motor molecular. A motilidade por deslizamento ocorreu a 3,0  $\mu\text{m/s}$  nos tricomas estreitos e 1,5  $\mu\text{m/s}$  para os tricomas largos. Inclusões de enxofre, corpos ricos em polifosfato, grânulos de carboidrato e vacúolos de nitrato foram observados, mas os corpos de polifosfato foram



observados apenas em tricomas não-vacuolados, assim como os vacúolos de nitrato, apenas nos tricomas vacuolados. A análise filogenética mostrou que os filamentos estreitos pertencem ao gênero *Beggiatoa* confirmando e dando suporte à caracterização morfológica como uma ferramenta para identificação destas bactérias. Os tricomas de *Beggiatoa* estão distribuídos no sedimento, bem como na coluna d'água. Nós observamos a migração da coluna d'água para o sedimento, na época de verão, provavelmente pela translocação da borda de oxigênio. Neste trabalho nós mostramos, pela primeira vez, que existem diferenças entre a ultra-estrutura celular de *Beggiatoa* estreitas e largas, as quais estão correlacionadas com a posição filogenética dos dois tipos de filamentos deste gênero.

Palavras-chave: Bactérias filamentosas; *Beggiatoa*; Hipersalino; Morfologia; Ultra-estrutura; Deslizamento

Rio de Janeiro  
2009

## ABSTRACT

Júlia Peixoto de Albuquerque

Morphological characterization and population distribution of sulfide oxidizing filamentous bacteria from *Beggiatoa* genus

Orientador: Ulysses Garcia Casado Lins

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Filamentous, gliding, sulfide-oxidizing bacteria of the genus *Beggiatoa* are ubiquitous in environments where detectable levels of hydrogen sulfide are observed. The main criterion to classify a microorganism as belonging to the genus *Beggiatoa* is its morphology, where it is considered every single filamentous gliding trichome containing characteristic sulfur globules. *Beggiatoa* stains Gram-negative, but its cell envelope structure is more complex than a typical Gram-negative bacteria. Here, we intended to investigate whether narrow and vacuolate *Beggiatoa* do differ morphologically as much as they do phylogenetically. So, we evaluated and differentiated, based on light, confocal laser scanning and electron microscopy, the structure and motility of narrow and large filamentous bacteria with morphological characteristics of *Beggiatoa* at Araruama and Itaipu Lagoons, a permanently and moderately hypersaline lagoon and a marine environment, respectively, both located at the east coast of Rio de Janeiro State, Brazil. We also confirmed narrow filaments identity as belonging to the genus *Beggiatoa* by sequencing *rrs* gene and analyzed the distribution of *Beggiatoa* populations from Araruama Lagoon in water column and sediment. The prokaryotic cells form trichomes with mean diameters of 4.46  $\mu\text{m}$  (narrow) and 13.54  $\mu\text{m}$  (large), and length from 10  $\mu\text{m}$  to more than 150  $\mu\text{m}$  and 30 mm, respectively. We observed structural differences related to the cell envelope from both types of trichomes. Narrow *Beggiatoa* cell envelope consisted of five layers whereas cell envelopes from large trichomes possess four layers. The gliding movement is similar to that described for gliding cyanobacteria, because we found fibrillar structures at the surface of the trichomes, the polysaccharide trail is formed from the region of the septa and a molecular motor seems to be present. Gliding motility occurred at 3.0  $\mu\text{m/s}$  for narrow trichomes and 1.5  $\mu\text{m/s}$  for large trichomes. Sulfur inclusions, polyphosphate rich bodies, carbohydrate granules and nitrate vacuoles were observed; but polyphosphate bodies were observed only in non-vacuolate trichomes, as nitrate vacuoles, only in vacuolated trichomes. Phylogenetic analysis showed that narrow filaments belong to the genus *Beggiatoa* confirming and supporting morphological characterization as a

useful tool for identifying these bacteria. The trichomes from *Beggiatoa* are distributed in sediment as well as in water column. We observed the migration of the trichomes from the water column to the sediment during summer, probably because there was a translocation of oxygen border. Here we showed, for the first time, that there are differences between the cell ultrastructure of narrow and large *Beggiatoa* which are correlated with the phylogenetic position of both types of filaments from this genus.

Keywords: Filamentous bacteria; *Beggiatoa*; Hypersaline; Morphology; Ultrastructure; Gliding

Rio de Janeiro  
2009

## ÍNDICE

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
1. Introdução.....	1
1.1 Bactérias Sulfurosas Incolores.....	1
1.2 O gênero <i>Beggiatoa</i> .....	5
1.3 Mecanismo de locomoção.....	12
2. Justificativa e objetivos do trabalho.....	18
3. Materiais e métodos.....	20
3.1 Locais de coleta.....	20
3.2 Coleta das amostras.....	21
3.3 Microscopia de luz e vídeo microscopia.....	21
3.4 Microscopia de fluorescência.....	23
3.5 Microscopia Confocal a Laser.....	23
3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	23
3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	24
3.7.1 Técnica de Contrastação Negativa.....	24
3.7.2 Rotina.....	24
3.7.3 Técnica de substituição a frio.....	25
3.8 Citoquímicas.....	25
3.8.1 Técnica do vermelho de rutênio.....	25
3.8.2. Localização de Cálcio.....	26
3.8.3 Método ósmio:imidazol.....	27
3.8.4 Microanálise de Raios-X.....	27
3.10 Biologia Molecular.....	27
3.10.1 Técnicas moleculares.....	27
3.10.2 Extração de DNA.....	28
3.10.3 PCR do gene <i>rrs</i> .....	29
3.10.4 Clonagem e seqüenciamento dos fragmentos amplificados por PCR.....	29
3.10.5 Análise filogenética do gene <i>rrs</i> .....	29
3.11 Análise das populações de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre.....	31

3.11.1 Amostragem.....	31
3.11.2 Biovolume relativo das bactérias filamentosas oxidantes de enxofre.....	32
4 Resultados.....	33
4.1 Estrutura das bactérias filamentosas oxidantes de enxofre.....	33
4.1.1 Medidas celulares e distribuição dos diâmetros entre as populações de <i>Beggiatoa</i> .....	33
4.1.2 Motilidade e estrutura do envelope celular.....	34
4.1.3 Corpos de inclusão e grânulos intracitoplasmáticos.....	35
4.2 Análise filogenética.....	37
4.3 Avaliação da densidade populacional das bactérias filamentosas do gênero <i>Beggiatoa</i> .....	39
4.3.1 Distribuição de filamentos de <i>Beggiatoa</i> sp. em diferentes profundidades em sedimento da Lagoa de Araruama.....	39
5 Discussão.....	41
5.1 Caracterização morfológica das bactérias filamentosas oxidantes de enxofre encontradas em lagoas costeiras do Rio de Janeiro.....	41
5.1.1 Distribuição dos diâmetros entre as populações de <i>Beggiatoa</i> spp. e locomoção.....	41
5.1.2 Estrutura do envelope celular e movimento.....	42
5.1.3 Corpos de inclusão, grânulos e vacúolos intracitoplasmáticos.....	44
5.2 Análise filogenética.....	48
5.3 Avaliação da densidade populacional das bactérias filamentosas do gênero <i>Beggiatoa</i> sp. na Lagoa de Araruama.....	51
6 Conclusões.....	57
7 Referências bibliográficas.....	59
PRANCHAS.....	66
ANEXO.....	95

## ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

## Tabelas

Tabela 1.....	14
Tabela 2.....	28

## Figuras

Figura 1.....	1
Figura 2.....	3
Figura 3.....	7
Figura 4.....	15
Figura 5.....	16
Figura 6.....	20
Figura 7.....	21
Figura 8.....	22
Figura 9.....	68
Figura 10.....	68
Figura 11.....	70
Figura 12.....	70
Figura 13.....	72
Figura 14.....	74
Figura 15.....	76
Figura 16.....	76
Figura 17.....	78
Figura 18.....	80
Figura 19.....	80
Figura 20.....	82
Figura 21.....	84
Figura 22.....	86
Figura 23.....	88
Figura 24.....	90
Figura 25.....	90
Figura 26.....	92
Figura 27.....	92
Figura 28.....	94

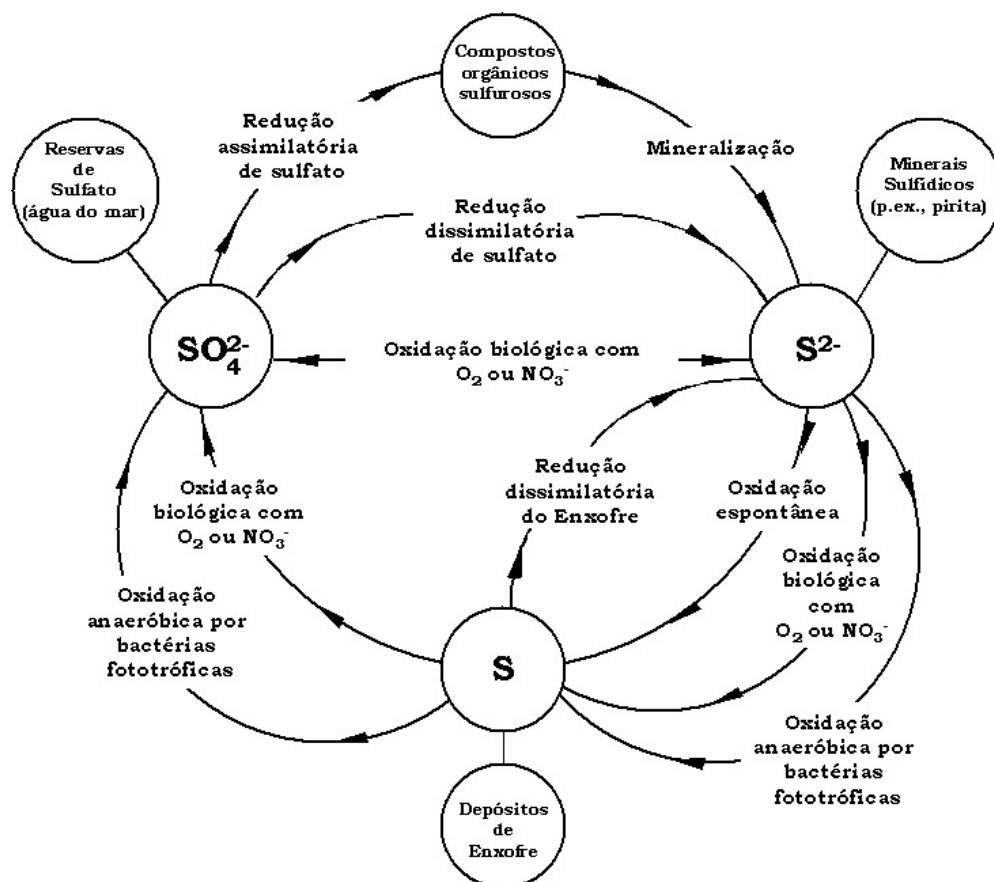
## LISTA DE ABREVIATURAS

- 16S rRNA – Sub-unidade 16S do RNA ribossomal
- AMP – Monofosfato de Adenosine
- APS redutase – 5'Adenilsulfato Redutase
- ATP – Trifosfato de Adenosina
- BSA – Soro Albumina-Bovino (Bovine Serum Albumine)
- CNA – Companhia Nacional de Álcalis
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- dNTP – Desoxinucleotídeo Trifosfato
- EGTA – Ácido Etilenoglicol Tetra-Acético
- FVA – Filamento Vacuolado Aderido (VAF - Vacuolated Attached Filament)
- MCL – Microscopia Confocal a Laser
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- NCBI – National Center for Biotechnology Information
- PCR – Reação da Polimerase em Cadeia (Polymerase Chain Reaction)
- PHB – poli- $\beta$ -hidroxibutirato
- RNA – Ácido Ribonucléico
- SeqMatch – Sequence Match

## 1 Introdução

### 1.1 Bactérias Sulfurosas Incolores

A expressão “bactérias sulfurosas incolores” tem sido utilizada para designar os procaríotos que são capazes de utilizar compostos sulfurosos inorgânicos, total ou parcialmente reduzidos (sulfetos, enxofre e sulfetos orgânicos), como fonte de energia para o crescimento (ROBERTSON & KUENEN, 1999). O ciclo do enxofre tem uma parte oxidativa e uma redutora, as quais, na maioria dos ecossistemas, estão em equilíbrio. Entretanto, este balanço não acontece a todo o momento, e acúmulos de produtos intermediários como o enxofre, sulfetos de ferro e sulfetos de hidrogênio, são eventualmente encontrados. As bactérias sulfurosas incolores desenvolvem um importante papel na parte oxidativa do ciclo do enxofre, principalmente por estarem envolvidas nas etapas onde  $S^{2-}$  e  $S$  são oxidados com oxigênio e nitrato, levando à formação do enxofre elementar e do sulfato, produtos comuns da oxidação do sulfeto (Figura 1).



**Figura 1:** O ciclo do enxofre. As bactérias sulfurosas incolores estão envolvidas principalmente nas etapas onde  $S^{2-}$  e  $S$  são oxidados com  $O_2$  ou  $NO_3^-$  (Adaptado de BOS & KUENEN, 1983).



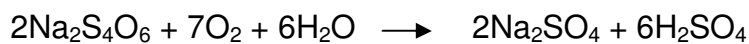
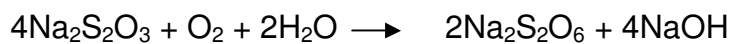
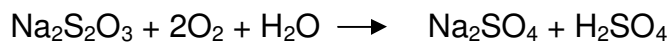
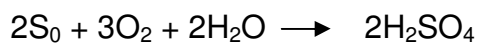
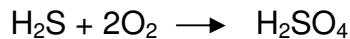
O adjetivo “incolor” é utilizado pela ausência de fotopigmentos nestas bactérias, embora seja possível observar que colônias ou culturas densas podem apresentar coloração rosa ou marrom, por causa da alta concentração de citocromo. Existem diferentes tipos de bactérias sulfurosas incolores, filogeneticamente distintas e com diversas propriedades morfológicas, fisiológicas e ecológicas, além de serem encontradas em vários ambientes (ROBERTSON & KUENEN, 1999).

O grupo das bactérias sulfurosas incolores compreende diferentes tipos celulares, como bastonetes, espirilos, cocos e células filamentosas, que podem ultrapassar 100 µm de comprimento (NELSON, WIRSEN & FARAH, 1989; KALANETRA, HUSTON & NELSON, 2004). Além do tamanho e forma das células, outras características morfológicas devem ser consideradas: corpos de inclusão contendo enxofre ou poli-β-hidroxibutirato (PHB), número e localização de flagelos, e tamanho, cor e forma das colônias, quando o microrganismo é cultivável.

As bactérias sulfurosas incolores têm sido subdivididas pelo seu tipo fisiológico, definido principalmente pelo seu metabolismo de carbono. O espectro metabólico deste grupo bacteriano varia de autotróficos obrigatórios, utilizando compostos reduzidos de enxofre como fonte de energia, a heterotróficos estritos, baseado nas suas fontes de carbono e energia. Além de compostos sulfurosos inorgânicos, algumas espécies podem obter energia a partir da oxidação de outros compostos inorgânicos, como o hidrogênio ou ferro. Assim como ocorrem variações com relação ao substrato, também ocorrem variações na utilização do aceptor final. Embora a maioria destas bactérias requeira oxigênio, algumas são capazes de crescer anaerobicamente utilizando óxidos nitrogenados (SEGERER & STETTER, 1989), onde compostos orgânicos ou hidrogênio servirão de doadores de elétrons. Algumas das reações que geram energia a partir de compostos sulfurosos inorgânicos reduzidos utilizando oxigênio e nitrato como doadores de elétrons estão apresentados na Figura 2.

Em habitat natural, os compostos sulfurosos reduzidos disponíveis tendem a ser enxofre ou sulfetos. O sulfeto de hidrogênio é normalmente encontrado no ambiente, principalmente em sedimentos anóxicos, derivados das atividades das bactérias redutoras de sulfato, além de algumas algas e

cianobactérias (ANDREAE & BERNARD, 1984). Um dos principais fatores determinantes do local onde estas bactérias são encontradas é a reação que ocorre entre o sulfeto e o oxigênio; a necessidade dos dois compostos força estes microrganismos a estabelecerem nichos especializados, que ocorrem na interface das regiões óxica:anóxica onde, simultaneamente, o sulfeto age como doador de elétrons e o oxigênio, como acceptor.



**Figura 2:** Exemplos de reações realizadas por bactérias sulfurosas incolores para obter energia para o crescimento. Dependendo da taxa de substratos orgânicos e inorgânicos suplementados no meio, diferentes tipos fisiológicos podem ser selecionados (Adaptado de ROBERTSON & KUENEN, 1999).

Outros habitats onde é possível encontrar este grupo de bactérias são as complexas comunidades em torno das fendas hidrotermais, onde o sulfeto é de origem geológica (JANNASCH, 1985, 1988), e em locais associados a atividades humanas, como as estações de tratamento de esgotos. Neste último caso, os ambientes artificiais formados nos biorreatores impõem parâmetros seletivos que não são encontrados na natureza, de forma que os substratos estão em abundância e condições mais estáveis do que em situações naturais (ROBERTSON & KUENEN, 1983).

A posição da interface óxica:anóxica eventualmente muda, de acordo com a corrente marinha na superfície do sedimento ou devido à atividade do ciclo da fotossíntese oxigênica. Desta forma, muitas bactérias sulfurosas incolores são altamente móveis para que seja possível o rápido re-alojamento dentro do gradiente de oxigênio. De acordo com DUSENBERY (1992), a princípio a quimiotaxia pode ser realizada de duas formas diferentes: a *taxia verdadeira* ocorre quando a resposta ao gradiente químico é *direta* ou *direcional*, ou seja, a direção do movimento do organismo está correlacionada com a direção do gradiente. Quando a resposta for *indireta* ou *não-direcional*, o comportamento será denominado *cinose*, embora o termo *quimiotaxia* seja utilizado para designar qualquer tipo de comportamento quimiosensorial (THAR & FENCHEL, 2001).

Gradientes sulfeto e oxigênio ocorrem em corpos d'água estratificados, bem como em solos e sedimentos. Estes gradientes podem alcançar a extensão de alguns micrômetros de espessura em biofilmes microbianos ou na superfície de sedimentos a muitos metros em um corpo d'água estratificado (JØRGENSEN, KUENEN & COHEN, 1979; ROBERTSON & KUENEN, 1999). Se a interface óxica:anóxica estiver posicionada dentro ou diretamente na superfície do sedimento, a maior abundância provavelmente será de espécies de bactérias incolores oxidantes de enxofre com motilidade associada a superfícies (*Beggiatoa*, motilidade por deslizamento; *Achromatium*, motilidade por rolamento) (MØLLER, NIELSEN & JØRGENSEN, 1985; HEAD *et al.*, 2000). Entretanto, se a produção de sulfeto no sedimento é suficientemente alta, a borda óxica:anóxica se desloca acima desta superfície. Contanto que a água abaixo esteja em movimento constante e saturada de oxigênio, esta borda será posicionada na camada difusiva que recobre o sedimento. Neste caso, somente bactérias microaerofílicas com motilidade de natação livre, como *Thiovulum* e *Ca. Ovobacter propellens* (FENCHEL & THAR, 2004) conseguirão se posicionar na interface óxica:anóxica (THAR & FENCHEL, 2005).

Os gêneros bacterianos *Beggiatoa* e *Thiovulum* são representantes do grupo de bactérias sulfurosas incolores que vivem na zona de transição entre oxigênio e sulfeto, em ambientes aquáticos. Estas bactérias competem constantemente com a oxidação química espontânea do sulfeto, de forma que

estão bastante adaptadas a esta condição, crescendo em faixas mucilagenosas, uma vez que ambas as espécies excretam muco, ao longo do gradiente químico, na região de concentração ideal de oxigênio e sulfeto (STROHL & LARKIN, 1978; WIRSEN & JANNASCH, 1978). Apesar de buscarem concentrações próximas dos mesmos compostos, as bactérias representantes destes dois gêneros bacterianos se encontram em microhabitats distintos; enquanto os tapetes de *Beggiatoa* são geralmente encontrados na superfície do sedimento, os véus de *Thiovulum* são formados na coluna d'água, onde o muco parece ajudar a fornecer uma certa rigidez ao véu, ocasionando a expansão da zona anóxica para dentro da água (JØRGENSEN & REVSBECH, 1983).

## 1.2 O gênero *Beggiatoa*

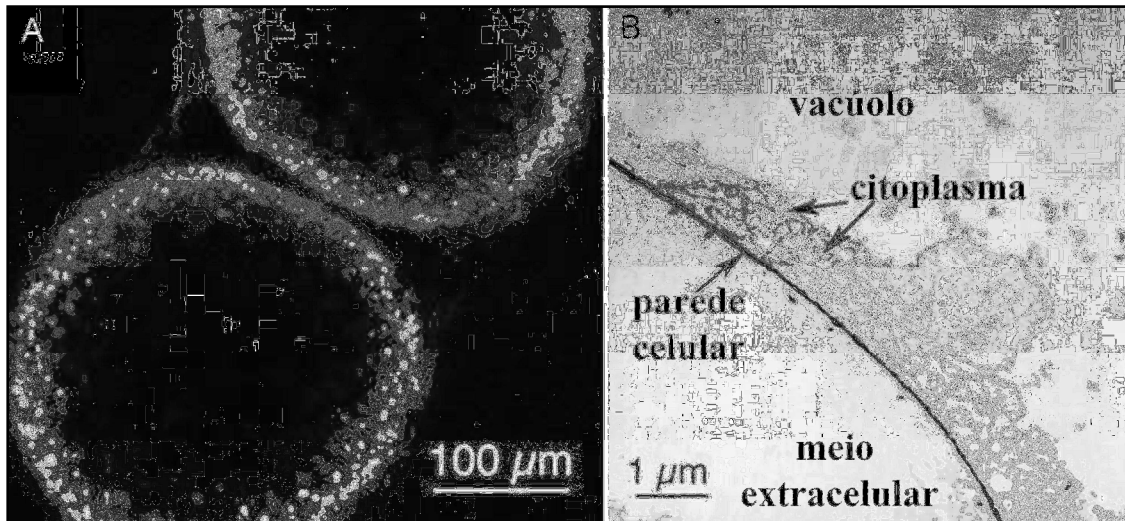
O primeiro gênero de bactéria filamentosa sulfurosa incolor descrito foi o gênero *Beggiatoa* (BERGEY'S MANUAL, 1994). Este é composto por bactérias filamentosas, que coram como Gram-negativas, oxidase positivas, catalase negativas, cujo comprimento varia de 1 a mais de 120  $\mu\text{m}$  (STROHL, 1989; NELSON, WIRSEN & FARAH, 1989, KALANETRA, HUSTON & NELSON, 2004); são aerofílicas ou microaerofílicas, quimiorganotróficas ou autotróficas facultativas e a reprodução ocorre por fissão binária transversal (BERGEY'S MANUAL, 1994), aparentemente com a produção de uma célula de sacrifício, denominada necrídia (STROHL & LARKIN, 1978). Estes filamentos, ou tricomas, são compostos por células achatadas, podendo ser encontradas também células cilíndricas que podem variar, em cultura, de 1,5 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2 a 5  $\mu\text{m}$  de largura (FAUST & WOLFE, 1961; SCOTTEN & STOKES, 1962). Os tricomas são incolores, se locomovem por deslizamento ("gliding") e contêm inclusões de enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ), poli-fosfato, nitrato e poli- $\beta$ -hidroxibutirato (KOJIMA & FUKUI, 2003).

O modelo estrutural definido para as bactérias filamentosas oxidantes de enxofre do gênero *Beggiatoa* é baseado nos dados morfológicos obtidos a partir de estirpes da única espécie descrita *B. alba* (STROHL, GEFERS & LARKIN, 1981; STROHL, HOWARD & LARKIN, 1982), isolada de água doce e mantida em meio de cultura. De acordo com os dados publicados, nesta espécie as inclusões de enxofre estão localizadas no periplasma, presas em

invaginações da membrana citoplasmática. Os glóbulos de enxofre podem estar envolvidos por um envoltório não-unitário (multi-camadas) ou por um envelope composto por uma única camada protéica (STROHL, GEFERS & LARKIN, 1981; STROHL, HOWARD & LARKIN, 1982). Estirpes do gênero *Beggiatoa* podem ser diferenciadas de outros gêneros que contêm inclusões de enxofre porque não apresentam pigmento fotossintético, os filamentos são morfologicamente diferentes dos filamentos das bactérias púrpuras sulfurosas e as outras bactérias do grupo podem ser rapidamente diferenciadas (*Thiotrix* - não móvel, *Thioploca* - envoltório comum para vários filamentos distintos).

Somente em poucos gêneros bacterianos, dentre eles algumas estirpes marinhas de *Beggiatoa* spp. (além de *Thioploca* spp. e *Thiomargarita namibiensis*) foram reportados grandes vacúolos internos, que compreendem 40 a 98%, ou mais, do biovolume celular (Figura 3) (OTTE *et al.*, 1999; KOJIMA & FUKUI, 2003; MUßMANN *et al.*, 2003). A maioria das bactérias com vacúolos testadas possui um alto nível interno de nitrato (15 a 800 mM), representando 400 a 20.000 vezes acima do nível do ambiente (MCHATTON *et al.*, 1996; KOJIMA & FUKUI, 2003). Apesar de nunca ter sido provado, é possível que a maioria, senão todo o nitrato, seja estocado no vacúolo, onde serve como acceptor de elétrons, permitindo a oxidação do sulfeto sob condições anaeróbicas e aumentando a flexibilidade ecofisiológica destas estirpes (KALANETRA, HUSTON & NELSON, 2004). Uma característica observada em todas as estirpes isoladas de água doce foi a produção de inclusões de poli- $\beta$ -hidroxibutirato. Esta deposição parece estar correlacionada à quantidade de acetato no meio e também à alta aeração (KOWALLIK & PRINGSHEIM, 1966; PRINGSHEIM, 1964), podendo constar de mais de 50% do peso seco total, sob estas condições, na ausência de sulfeto (GÜDE, STRHOL & LARKIN, 1981).

O mecanismo que controla a formação da necrídia, durante a divisão celular, ainda não é conhecido. KAMP, RØY & SCHULZ-VOGT (2008) fizeram filmes de *Beggiatoa* sp. cultivada que forneceram informações sobre o tempo que leva para a quebra do filamento e a posição onde ela ocorre. A hipótese defendida pelo grupo é a de que o aparecimento da célula de sacrifício levaria à interrupção da comunicação célula-célula. Conseqüentemente, ao invés de haver a paralisação do movimento do indivíduo como um todo, o filamento



**Figura 3:** Vacúolo intracitoplasmático presente em bactérias “largas” oxidantes de enxofre, geralmente composto por nitrato em concentrações 400-20.000X acima do nível do ambiente. (Adaptado de SCHULZ-VOGT, 2006).

continuará se movimentando e se enroscando, levando à formação de laços e, então, à quebra do filamento pela inversão da direção de deslizamento pelas duas partes. Logo, a ocorrência das células de sacrifício aumentaria a probabilidade de formação dos laços e quebra dos filamentos, levando ao aumento da população.

O gênero *Beggiatoa* contém estirpes marinhas e de água doce que são encontradas na interface óxica:anóxica ao longo dos gradientes sulfeto/oxigênio em diversos ambientes aquáticos, podendo ser encontradas inclusive em estações de tratamento de esgoto, caracterizando estas bactérias como boas indicadoras de poluição. Densos tapetes de culturas axênicas em sedimentos contendo sulfeto são frequentemente observados, especialmente em sedimentos marinhos, onde a taxa de produção de sulfeto pode ser bastante alta. A grande eficiência na ‘captura’ de sulfeto pelos filamentos de *Beggiatoa* propicia o acúmulo do sulfeto abaixo do tapete. Desta forma, os filamentos agem como uma ‘armadilha’ de sulfeto, evitando que o sulfeto tóxico chegue à coluna d’água; durante este processo ocorre o enriquecimento do conteúdo de enxofre na superfície do sedimento, que leva a mudanças na composição da comunidade e induz a migração de parte das espécies oxidantes de enxofre para camadas superiores (ROBERTSON & KUENEN,

1999). O papel fisiológico da oxidação do sulfeto e a acumulação do enxofre são complexos e divergem entre os diferentes tipos fisiológicos de *Beggiatoa*.

As diferenças fisiológicas entre as estirpes MS-81-1c (autotrófica estrita) e MS-81-6 (autotrófica facultativa) parecem estar relacionadas ao aparato enzimático responsável pela oxidação do sulfeto (HAGEN & NELSON, 1997). A estirpe MS-81-1c utiliza APS redutase na oxidação AMP-dependente do sulfeto a APS; já a MS-81-6 não possui atividade de APS redutase e a ATP sulfurilase parece desempenhar um papel assimilatório, uma vez que MS-81-6 cresce com acetato ou sulfato como fonte única de enxofre (NELSON & JANNASCH, 1983). Uma segunda via de oxidação do sulfeto, AMP-independente e aparentemente associada à membrana, é encontrada em três estirpes de *Beggiatoa* (MS-81-1c, MS-81-6 e OH-75-2a); uma vez que as sulfeto-oxidases estão localizadas na membrana celular é bastante aceitável que estejam integradas à cadeia respiratória e utilizem o citocromo *c* como acceptor de elétrons (HAGEN & NELSON, 1997). A estirpe heterotrófica de água doce OH-75-2a possui um espectro de enzimas oxidantes de enxofre bem similar ao das autotróficas facultativas. A *Beggiatoa* D-402, autotrófica facultativa, compartilha características importantes com as estirpes MS-81-6 e OH-75-2a: ausência de APS-redutase AMP-dependente, enzimas não-envolvidas com fosforilação em nível de substrato parecem ser ativas e reguladas positivamente em cultura autotrófica com tiosulfato como fonte de enxofre (GRABOVICH *et al.*, 2001). Em 1981 foi visto que OH-75-2a utilizou glóbulos de enxofre acumulados durante a oxidação aeróbia com tiosulfato para sustentar o metabolismo e o crescimento sob vários dias de anóxia (NELSON & CASTENHOLZ, 1981). A redução do enxofre presente nos glóbulos a sulfeto, em conjunto com a síntese de novo do material celular, foi vista em *B. alba*, estirpe B18LD, durante a incubação sob anóxia (SCHMIDT *et al.*, 1987). Este mecanismo ajudaria os filamentos a sobreviverem em períodos de anóxia em seus habitats naturais. Entretanto, *B. alba* continua dependente do oxigênio para a oxidação do sulfeto, pois como nas autotróficas estudadas, a oxidação do sulfeto requer oxigênio como acceptor de elétrons.

As bactérias do gênero *Beggiatoa* demonstram uma grande versatilidade também na utilização de compostos nitrogenados, tanto como fonte de nitrogênio para o crescimento, quanto como acceptor final de elétrons

na cadeia respiratória (nitrato). Estirpes de água doce assimilam vários compostos nitrogenados para crescer: *B. alba* pode utilizar nitrato, nitrito, amônia e casaminoácidos como fontes únicas de nitrogênio (MEZZINO, STROHL & LARKIN, 1984) e a estirpe B18LD inclui ainda em seu metabolismo uréia, aspartato, asparagina, alanina e tiouréia (VARGAS & STROHL, 1985). Em 1990, SWEERTS *et al.* sugeriram a possibilidade da oxidação do sulfeto através da denitrificação por estirpes de água doce, mas apenas recentemente (KAMP, STIEF & SCHULZ-VOGT, 2006) foi demonstrado que uma estirpe de água doce era capaz de realizar a oxidação anaeróbica do sulfeto com a utilização do nitrato. A *Beggiatoa* marinha vacuolada encontrada em Monterey Canyon mostrou um nível de nitrato-redutase mais elevado que outras estirpes estudadas até então (MCHATTON *et al.*, 1996) e SAYAMA *et al.* (2005) observaram que a estirpe marinha estudada por eles era capaz de reduzir o íon nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a íon amônia ( $\text{NH}_4^+$ ), sob condições anóxicas (redução dissimilatória do nitrato a amônio).

Filamentos encontrados no sedimento marinho em Eckenförde Bay, uma baía na Alemanha, parecem estar predominantemente distribuídos nas zonas óxicas e sub-óxicas, evitando a zona sulfídica (PREISLER *et al.*, 2007). Neste estudo foi sugerido que o sulfeto seria levado à zona sub-óxica pela redução de sulfato local e difusão ascendente a partir da zona sulfídica e apenas uma pequena fração do aporte de sulfeto na zona sub-óxica teria sido oxidado pelos tricomas (menos de 10% do enxofre é de origem intracelular, a maior parte se encontra abaixo da zona sub-óxica, onde não foi detectada a presença de *Beggiatoa*). Mesmo assumindo que a oxidação local total do sulfeto atingisse apenas o nível do enxofre, levando quatro sulfetos a serem oxidados por um nitrato (Sayama *et al.*, 2005), a atividade de *Beggiatoa* seria insignificante no total da oxidação do sulfeto, com relação à oxidação química, ao contrário do que se pensava até então.

Também em 2007, HINCK *et al.* estudaram o ciclo diário de uma *Beggiatoa* vacuolada encontrada em ambiente hipersalino (Lago Chiprana, Espanha) e foi observado que durante o dia os filamentos se encontravam concentrados na zona de co-ocorrência de sulfeto e oxigênio; já à noite, havia a formação de duas populações de *Beggiatoa*, uma na superfície do tapete e a outra, na região anóxica do tapete. Neste caso, provavelmente a oxidação do



sulfeto ocorreu com a utilização do oxigênio como acceptor de elétrons; simultaneamente, os filamentos poderiam concentrar nitrato, presumivelmente, nos vacúolos intracelulares, enquanto que na zona de transição óxica:anóxica, outra comunidade microbiana do tapete produziria nitrato durante a oxidação aeróbica da amônia (nitrificação) (HINCK *et al.*, 2007).

A capacidade das bactérias deste gênero em estocar nitrato parece mantê-las ativas durante a noite, enquanto a maioria das espécies presentes no tapete é anóxica e, conseqüentemente, a atividade metabólica dos oxidantes de enxofre aeróbios não é favorecida. Entretanto, aparentemente os filamentos não utilizam sua resposta tática para seguir a faixa de retração do oxigênio durante a noite. O estoque de nitrato também os leva, à noite, a ficar perto da posição encontrada durante o dia. Enquanto os filamentos marinhos utilizam várias ferramentas para migrar através de um gradiente permanentemente anóxico, esta estirpe hipersalina (HINCK *et al.*, 2007) parece utilizar o mesmo artifício para se posicionar em um nicho ótimo dentro de um ambiente dinâmico. No caso da *Beggiatoa* marinha de Eckenförde Bay (PREISLER *et al.*, 2007), filamentos contendo estoques de enxofre e 270 mM de nitrato interno foram capazes de viver independentemente de fontes externas por mais de um mês, em microcosmo com sedimento livre de oxigênio e nitrato. Após 2 semanas os filamentos tinham perdido 70% do nitrato intracelular, o qual foi totalmente consumido em três semanas. Os filamentos permaneceram vivos e móveis até a quinta semana, quando perderam a motilidade, mas permaneceram intactos, mostrando o papel do acúmulo de nitrato na sobrevivência de *Beggiatoa* sob condições anóxicas.

A idéia de que as adaptações morfológicas e comportamentais às condições físico-químicas sejam responsáveis pela formação de nichos separados colonizados por bactérias filamentosas gigantes foi evidenciada também no estudo das populações bacterianas oxidantes de enxofre encontradas em águas de um grande sistema de cavernas na Itália (Frasassi) (MACALADY *et al.*, 2008). DILLON *et al.* (2009) estudaram a variação espaço-temporal na comunidade bacteriana de tapetes encontrados em um ambiente hipersalino estratificado e demonstraram que a migração é um fenômeno mais generalizado do que descrito até então. Não só a população de *Beggiatoa* mudou a localização de acordo com o período (diurno/noturno), como

observado por HINCK *et al.* (2007), mas também houve mudanças nas populações de outros gêneros bacterianos.

Baseado na análise filogenética do gene *rrs*, as bactérias sulfurosas incolores filamentosas formam um grupo bem definido dentro do grupo das *Gammaproteobacteria* (todas as *Beggiatoa* spp., marinhas e de água doce, todas as *Thioploca* spp., marinhas e de água doce, e *Thiomargarita namibiensis*). Os gêneros bacterianos com representantes que possuem grandes vacúolos internos formam um ramo bem definido dentro desse grupo, incluindo todas as *Beggiatoa* spp. marinhas, todas as *Thioploca* spp. marinhas e algumas de água doce, e *Thiomargarita namibiensis* (KOJIMA & FUKUI, 2003; KOJIMA, TESKE & FUKUI, 2003; MUßMANN *et al.*, 2003).

Uma comunidade de *Thioploca* presente no sedimento da costa do Chile foi analisada através da comparação das sequências do gene *rrs* e foi observado que os diferentes morfotipos de *Thioploca* eram também geneticamente distintos (SCHULZ *et al.*, 2000). Por outro lado, quando uma estirpe de *Beggiatoa* sp. gigante e outra de *Thioploca ingrlica*, com diâmetro próximo, foram analisadas, foi observado que as sequências que codificam o 16S rRNA de ambos os gêneros são quase idênticas (TESKE *et al.*, 1999). Estes dados sugerem que existe uma correlação entre a similaridade morfológica, baseada primeiramente no diâmetro dos tricomas (filamentos) e na dimensão celular, e a relação dos genes *rrs*. Em 2003, um estudo realizado com dois isolados de *Thioploca* sp., um isolado do Japão e outro da Alemanha, confirmam esta hipótese, uma vez que eram morfológicamente semelhantes e geneticamente muito próximos (KOJIMA, TESKE & FUKUI, 2003).

AHMAD, KALANETRA & NELSON (2006) realizaram a análise filogenética de várias bactérias vacuoladas oxidantes de enxofre não-cultivadas, em conjunto com sequências de bactérias cultivadas, na tentativa de elucidar a relação filogenética entre as bactérias vacuoladas e não-vacuoladas reconhecidas como *Beggiatoa* até então. Todos os representantes dos gêneros que fazem parte deste grupo, *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Thiomargarita* e VAF constituíram um grupo monofilético com um valor robusto de *bootstrap* de 84%. Este grupo monofilético estava subdividido em grupos distintos: bactérias vacuoladas marinhas, VAF, *Thioploca* de água doce, *Beggiatoa* estreita de água doce, *Beggiatoa* estreita marinha e *Thiomargarita*. A estirpe

hipersalina estudada por HINCK *et al.* (2007), por eles classificadas como estreita (6  $\mu\text{m}$ ), foi agrupada juntamente com a estirpe MS-81-6, estreita e não vacuolada, em 91% de similaridade. Apesar de diferirem em pelo menos duas características morfológicas, ambas parecem tolerar salinidades acima da referente à água do mar; portanto, a presença de vacúolos e a capacidade de acumular nitrato parecem não ser restritas às *Beggiatoa* de maiores diâmetros como descrito anteriormente por KALANETRA, HOUSTON & NELSON (2004).

### 1.3 Mecanismo de locomoção

As superfícies são características importantes em muitos ambientes, constituindo sítios atraentes para a colonização bacteriana, frequentemente resultando na formação de complexos biofilmes (MARSHALL, 1992; COSTERTON *et al.*, 1995). As bactérias desenvolveram estratégias eficientes para se locomover sobre estas superfícies, de forma a encontrarem o ambiente mais favorável, as quais estão de alguma forma relacionadas à quimiotaxia, aerotaxia, fototaxia e taxia como uma reação a diferenças na osmolaridade, viscosidade e no campo magnético da Terra.

Vários microrganismos, tais como *Proteus mirabilis*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Serratia marcescens*, possuem numerosos flagelos para se difundirem sobre superfícies úmidas, em um processo denominado “swarming motility” (HARSHEY, 1994). Outras bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria gonorrhoeae*, utilizam pílí tipo IV para a locomoção (“twitching motility”) (HENRICHSEN, 1983). Finalmente, diversas bactérias como *Beggiatoa alba*, *Oscillatoria princeps*, *Myxococcus xanthus*, *Flavobacterium johnsoniae* e muitas outras, se espalham sobre superfícies através de um processo de locomoção denominado mobilidade por deslizamento (“gliding motility”) (BURCHARD, 1982; HOICZYCK & BAUMEISTER, 1995; HOICZYCK, 2000; MC BRIDE, 2000). Esta última é definida como uma forma de translocação, associada a uma superfície, por um processo ativo que requer gasto de energia (MCBRIDE, 2001) e que geralmente segue o eixo celular longitudinal (BURCHARD, 1982).

Diversos ramos da árvore filogenética das eubactérias possuem bactérias deslizantes (Tabela 1), embora sejam mais comumente encontradas em três grandes grupos: mixobactérias (membros do ramo das  $\delta$ -

proteobactérias), cianobactérias e o grupo *Cytophaga-Flavobacterium*. Estas bactérias estão presentes em diversos ambientes, como boca humana, sedimentos marinhos e solo.

O deslizamento é uma propriedade comum a cianobactérias (HOICZYCK, 2000), assim como a bactérias filamentosas do gênero *Beggiatoa* (LARKIN & STROHL, 1983). As cianobactérias filamentosas deslizam a velocidades superiores a 10  $\mu\text{m}/\text{segundo}$  sobre superfícies de vidro úmidas e ocasionalmente revertem o sentido da direção do deslizamento (MCBRIDE, 2001). Geralmente, respondem à intensidade da luz ou comprimento de onda, e colônias inteiras podem migrar em direção a uma fonte de luz. Alguns filamentos de cianobactérias produzem pílí (MACRAE, DOBSON & MCCURDY, 1977) e é possível que tenham um determinado papel no movimento celular. Outras bactérias filamentosas parecem não possuir pílí, então outros mecanismos de propulsão devem ser empregados (ADAMS, ASHWORTH & NELMES, 1999).

Através dos anos têm sido propostos diferentes modelos para se explicar a mobilidade bacteriana por deslizamento, mas aparentemente existem diferentes tipos de “motores” para este tipo de locomoção (HOICZYCK & BAUMEISTER, 1998; YOUNDERIAN, 1998; ADAMS, ASHWORTH & NELMES, 1999; BHAYA *et al.*, 2000).

Foi observado que as bactérias deslizantes deixam rastros viscosos atrás de si (BURCHARD, 1982, HOICZYCK & BAUMEISTER, 1995). Esta liberação de material viscoso, composto de polissacarídeos (STROHL & LARKIN, 1978) que podem estar associados a polímeros (HUMPHREY, DICKSON & MARSHALL, 1979), provavelmente demanda um alto gasto energético para a bactéria e, em alguns casos, a sua perda pode ser observada em circunstâncias onde a bactéria provavelmente não necessita se locomover. Logo, seria compreensível se este material extracelular fosse necessário a uma ou mais funções vitais da célula. A expulsão direta deste material viscoso deve fornecer a força suficiente para o deslizamento (ADAMS, ASHWORTH & NELMES, 1999), além de funcionar como adesivo temporário, prendendo a bactéria ao substrato sobre o qual está deslizando (BURCHARD, 1982).

**Tabela 1.** <sup>a</sup>Domínios das eubactérias onde é encontrado o movimento por deslizamento (Adaptada de MCBRIDE, 2001)

Grupo bacteriano <sup>a</sup>	Gênero representativo de bactéria deslizante	Referência
Cianobactéria	<i>Oscillatoria</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Phormidium</i> , e outros	CASTENHOLZ & WATERBURY, 1989
Grupo Cytophaga-Flavobacterium	<i>Flavobacterium</i> <sup>b</sup> , <i>Cytophaga</i> , <i>Saprospira</i> , <i>Flexibacter</i> . e outros	LARKIN, 1989
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcus</i> , <i>Stigmatella</i> , <i>Chondromyces</i> , <i>Desulfonema</i> , e outros	LARKIN, 1989; MCCURDY, 1989
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Vitreoscilla</i> , <i>Simonsiella</i>	LARKIN, 1989
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lysobacter</i> , <b><i>Beggiatoa</i></b> , <i>Leucothrix</i> , <i>Thiothrix</i>	LARKIN, 1989
Bactérias verdes não-sulfurosas	<i>Chloroflexus</i> , <i>Herpetosiphon</i> , <i>Heliobacterium</i>	LARKIN, 1989; PFENING & TRUPER, 1989
Bactérias verdes sulfurosas	<i>Chloroherpeton</i>	PFENING & TRUPER, 1989
Planctomyces	<i>Isosphaera</i>	STALEY & FUERST, 1989
Bactérias Gram-positivas <sup>c</sup>	<i>Heliobacterium</i> , <i>Filibacter</i> , <i>Mycoplasma</i> <sup>d</sup>	CLAUSEN, JONES & STAKEBRANDT, 1985; KIRCHHOFF, 1992; PFENING & TRUPER, 1989

<sup>a</sup> Classificação filogenética baseada na análise de seqüências do gene *rrs*.

<sup>b</sup> Muitas bactérias previamente classificadas como pertencentes ao gênero *Flavobacterium* que não se locomovem por deslizamento foram reclassificadas em *Chryseobacterium* (BERNADET *et al.*, 1996).

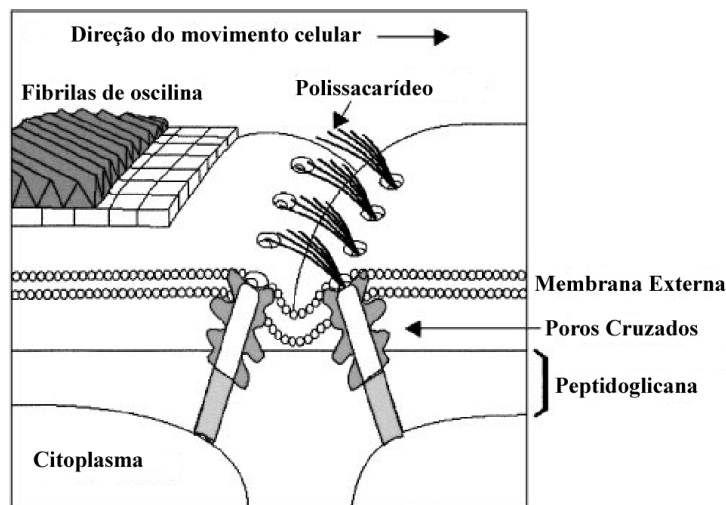
<sup>c</sup> Todas as bactérias deslizantes classificadas dentro do grupo "Gram-positivo" não possuem parede celular gram-positiva típica. Micoplasmas não possuem parede celular, *Heliobacterium chlorum* possui uma membrana externa e *Filibacter limicola* cora como gram-negativa e tem uma camada externa.

<sup>d</sup> Alguns, mas não todos os Micoplasmas, apresentam locomoção por deslizamento.

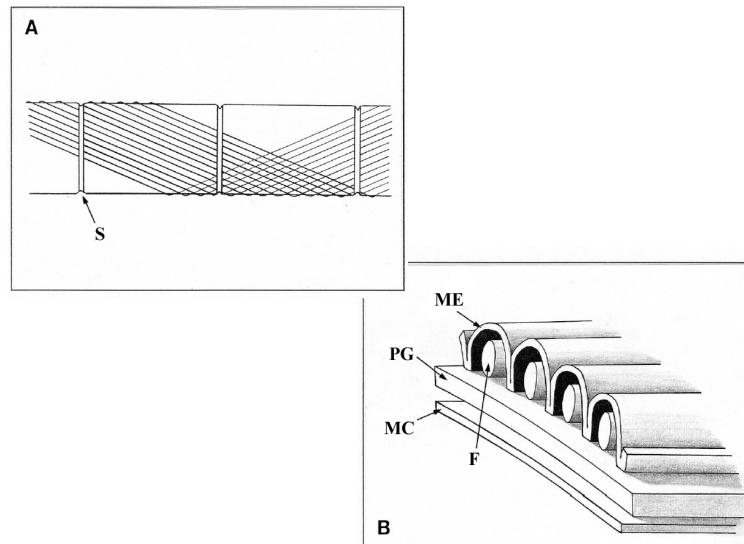
Estudos realizados em filamentos de *Anabaena variabilis* e *Phormidium uncinatum* revelaram a existência de um complexo de "poros cruzados" perto dos septos que separam as células de um filamento, os quais poderiam ter alguma função na secreção do polissacarídeo. Após ter sido observado que a direção da secreção do polissacarídeo é oposta à direção do movimento celular, foi sugerido que a extrusão do polissacarídeo seja responsável pela propulsão do filamento (HOICZYCK & BAUMEISTER, 1998).

Algumas cianobactérias têm um movimento rotatório conforme deslizam (ADAMS, ASHWORTH & NELMES, 1999; HOICZYCK, 2000). *Phormidium uncatum* possui uma “camada S” cobrindo seu envelope, intercalada por fibrilas paralelas compreendendo uma única proteína helicoidal essencial para o deslizamento: a oscilina (HOICZYCK & BAUMEISTER, 1997). A incorporação das fibras de oscilina ao modelo de extrusão do polissacarídeo conta para a rotação do filamento conforme ele é impulsionado para frente (Figura 4). Outro mecanismo proposto para explicar o deslizamento das cianobactérias filamentosas envolve a contração das fibrilas presentes na parede celular de alguns filamentos (Figura 5) (ADAMS, ASHWORTH & NELMES, 1999).

Sabe-se que o gene que codifica a oscilina é amplamente distribuído pelas cianobactérias, entretanto nenhuma análise genética detalhada foi reportada até hoje. Seu produto é uma glicoproteína com dois domínios estruturais, que possui um terminal amino com sítio para ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  (HOICZYCK & BAUMEISTER, 1997).



**Figura 4:** Modelo de extrusão de polissacarídeo que explica o movimento por deslizamento da cianobactéria filamentosa *Phormidium uncatum*. A secreção do polissacarídeo através dos poros cruzados seria responsável pela propulsão do filamento multicelular. A presença das fibras helicoidais de oscilina na superfície celular resulta na rotação do filamento conforme este se locomove (Figura adaptada de MCBRIDE, 2001).



**Figura 5:** Diagrama esquemático mostrando o aparato fibrilar na parede celular de *Oscillatoria* spp. (A) Parte de um filamento mostrando três septos. No septo (S), as fibrilas passam abaixo da camada que o circula. (B) Corte da parede celular, mostrando o arranjo das fibrilas (F) em relação à membrana externa (ME), membrana citoplasmática (MC) e a peptidoglicana (PG) (Figura adaptada de ADAMS, ASHWORTH & NELMES, 1999).

Apesar de existirem três mecanismos diferentes para o movimento por deslizamento em procariotos, dois pontos comuns emergem dos estudos sobre o deslizamento. Primeiro, o deslizamento envolve uma maquinaria secretória especializada que é requerida para a montagem de fibras associadas à membrana, que consiste de polissacarídeos, proteínas, ou uma mistura dos dois polímeros. Segundo, o deslizamento envolve um reconhecimento de componentes extracelulares e a atividade de transdutores atravessados na membrana para desencadear o movimento. Estes componentes parecem estar envolvidos diretamente com a comunicação célula-célula (YOUDEIRIAN, 1998).

O mecanismo de todas as outras formas de motilidade bem caracterizadas encontradas nos sistemas biológicos envolve motores de fibras deslizantes (PATE & DE JONG, 1990; HARTZELL & YOUDEIRIAN, 1995, ADAMS, ASHWORTH & NELMES, 1999). Estas fibras têm sido implicadas em pelo menos dois dos três diferentes mecanismos do deslizamento bacteriano. Segundo YOUDEIRIAN (1998), não seria surpreendente se os diferentes mecanismos de deslizamento fossem realmente dependentes de fibras

deslizantes, parecendo-se com os motores mais familiares actina-miosina e dineína-tubulina, encontrados nas células eucarióticas.

Em 2007 foi realizado um estudo sobre a implicação deste aparato fibrilar na motilidade de cianobactérias filamentosas deslizantes (READ, CONNELL & ADAMS, 2007). A sugestão de que este aparato estaria envolvido com a mobilidade por deslizamento (ADAMS, ASHWORTH & NELMES, 1999; MCBRIDE, 2001) foi reforçada, uma vez que *Oscillatoria* spp. possui camadas bastante espessas de peptidoglicana e que as fibrilas parecem ser bastante flexíveis, de acordo com os resultados obtidos no estudo. Este aparato está localizado imediatamente abaixo da membrana externa, de forma a fornecer e distribuir a força motiva para o deslizamento, que necessitaria de uma forte interação entre a superfície celular e o substrato sobre o qual o filamento se arrastaria. Além disso, o arranjo das fibrilas em relação ao maior eixo da estirpe A2 de *Oscillatoria* ajuda a explicar a rotação desta bactéria durante o deslizamento (READ, CONNELL & ADAMS, 2007).



## 2. Justificativa e objetivos

O modelo estrutural definido para bactérias do gênero *Beggiatoa* é baseado nas características morfológicas de filamentos isolados de água doce da única espécie descrita até hoje, *B. alba*. Ao longo dos anos, foram encontrados filamentos de bactérias oxidantes de enxofre “gigantes”, assim denominadas por serem capazes de atingir até 180  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Especula-se que o aumento de diâmetro dos filamentos seria devido à presença de vacúolos intracitoplasmáticos, relacionados à compartimentalização do nitrato. Entretanto, ainda não foi determinado se as diferenças existentes entre os filamentos “estritos” (2 - 6  $\mu\text{m}$ ) e “largos” (9 - 180  $\mu\text{m}$ ) de *Beggiatoa* sp. vão além da presença deste vacúolo.

Sabe-se que os dois tipos de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre (estrito e largo) são filogeneticamente distintos, baseado na análise do gene *rrs*. Os dados obtidos até hoje sugerem que existe uma correlação entre morfologia e filogenia, mas a identificação de bactérias pertencentes a este gênero tem sido baseada, principalmente, em dados filogenéticos. A única característica morfológica por vezes considerada tem sido o diâmetro dos filamentos, levando à distinção dos filamentos em estreitos e largos. Esta característica pode não ser suficiente para a distinção das bactérias encontradas neste grupo, uma vez que já foi visto o agrupamento de um filamento vacuolado com bactérias filamentosas estreitas não-vacuoladas.

Além disso, grupos bacterianos evolutivamente distantes podem apresentar alto grau de similaridade entre os genes que codificam o 16S rRNA. Da mesma forma, as micro-heterogeneidades existentes entre os genes *rrs* e a presença de diferentes cópias deste gene em um mesmo genoma, podem separar espécies filogeneticamente próximas. Desta forma, as características morfológicas e genotípicas são frequentemente utilizadas para a identificação e o reconhecimento de espécies morfológicamente distinguíveis obtidas de fontes naturais.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivos:

a) Estudar as bases estruturais do mecanismo de movimento por deslizamento realizado pelas bactérias filamentosas incolores oxidantes de enxofre encontradas nas lagoas de Araruama (ambiente hipersalino) e Itaipu

(ambiente salino), através de microscopia óptica, microscopia de varredura confocal a laser e microscopia eletrônica;

b) Verificar se existe correlação entre as diferenças estruturais observadas e a posição filogenética nos filamentos encontrados na Lagoa de Araruama, com base na análise da sequência completa do gene *rrs* (16S rRNA), através de biologia molecular;

c) Avaliar a distribuição e migração da população de *Beggiatoa* sp. em diferentes profundidades da Lagoa de Araruama.

✓ *Objetivos específicos*

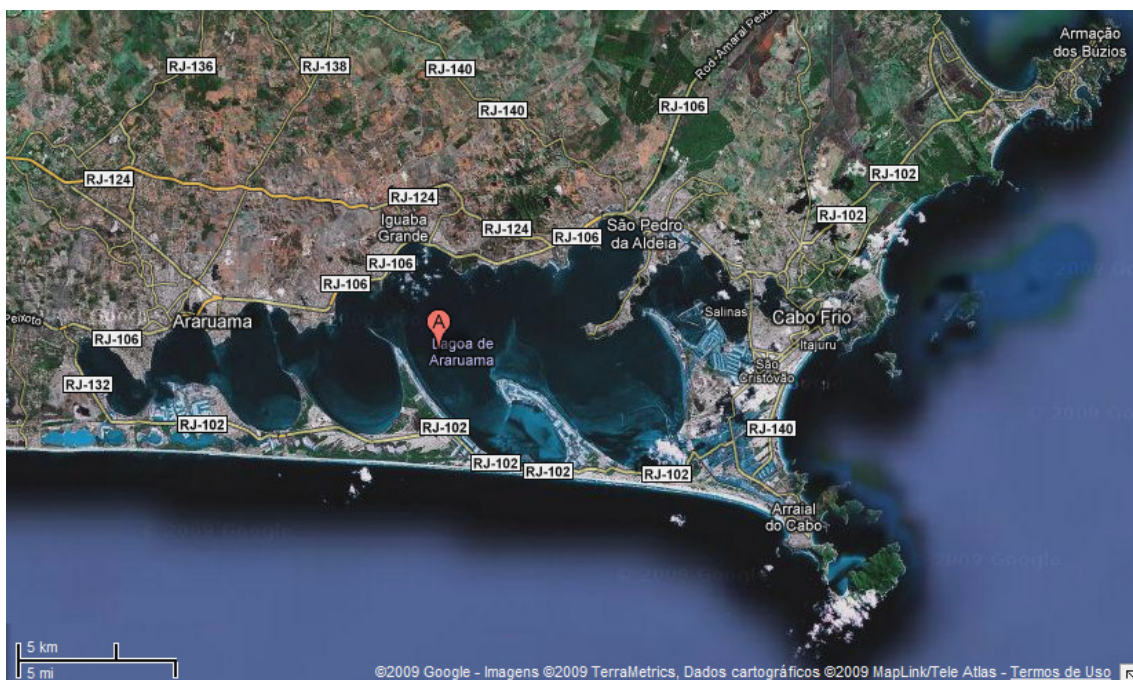
1. Caracterizar as diferentes populações de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre encontradas nas lagoas costeiras de Araruama e Itaipu;
2. Determinar a velocidade média de deslizamento dos filamentos oxidantes de enxofre;
3. Elucidar se há alguma estrutura fibrilar envolvida no mecanismo de extrusão do polissacarídeo liberado pelos filamentos durante o processo de deslizamento e inferir o seu papel na locomoção;
4. Através da microscopia eletrônica, verificar se há diferenças estruturais entre os diferentes tipos de filamentos encontrados nas lagoas costeiras e quais são elas;
5. Utilizar métodos citoquímicos para a localização de sítios de cálcio e a detecção de carboidratos e lipídios, visando um melhor entendimento da estrutura e do funcionamento celular;
6. Realizar a análise filogenética a partir do sequenciamento do gene *rrs* dos filamentos encontrados na Lagoa de Araruama, a fim de identificá-los em nível de gênero e validar a caracterização morfológica;
7. Determinar biovolume relativo, biomassa e frequência destes tricomas, analisando sua distribuição nas primeiras camadas dos sedimentos na tentativa de inferir sua importância nos ambientes estudados.

### 3 Materiais e métodos

#### 3.1 Locais de coleta

Os locais de coleta foram a Lagoa de Araruama, localizada no Estado do Rio de Janeiro, na Região dos Lagos, entre as latitudes de 22°50'S e 22°57'S e as longitudes 42°00'W e 42°44'W; e a Lagoa de Itaipu (43°04'W, 22°57'S) localizada na cidade de Niterói, na Região Norte-fluminense do Estado do Rio de Janeiro.

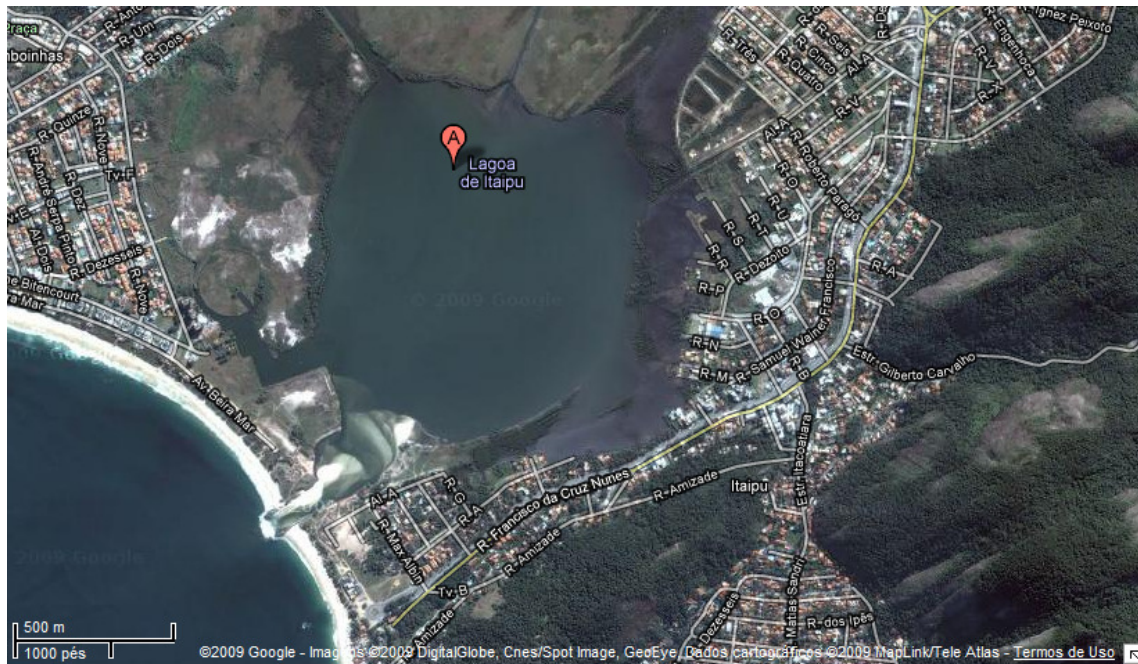
Uma das maiores lagoas hipersalinas do mundo, a Lagoa de Araruama (Figura 6) possui uma salinidade média de 52‰, nos dias atuais, que corresponde a uma vez e meia a do oceano. A salinidade pode oscilar entre 52‰ e 77‰. Esta salinidade é causada pelo pequeno aporte de água doce dos rios, elevada evaporação e reduzida precipitação, pequena troca com o oceano e lenta renovação da água (KJERFVE *et al.*, 1996).



**Figura 6:** Fotografia via satélite da Lagoa de Araruama (Fonte: Google-Imagens, 2009; Dados cartográficos TerraMetrics, 2009).

Já a Lagoa de Itaipu (Figura 7) possui uma área de 1 Km<sup>2</sup> e uma área alagadiça de mais de 2 Km<sup>2</sup>. Sua salinidade média é de 30‰, a profundidade média é inferior a 1,0 m e as profundidades máximas são de 2,0 m. Encontra-se ligada à Lagoa de Piratininga pelo Canal de Camboatá, construído para minimizar os problemas de cheias na região (KUCHLER, 2005), o que

ocasionou o escoamento se suas águas para a Lagoa de Itaipu e, seqüencialmente, para o Oceano Atlântico.



**Figura 7:** Fotografia via satélite da Lagoa de Itaipu (Fonte: Google-Imagens, 2009; Dados cartográficos GeoEye, 2009).

### 3.2 Coleta das amostras

Amostras de sedimentos e coluna d'água das lagoas foram coletados em frascos de plástico, parcialmente fechados, os quais foram mantidos à temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ), sob penumbra. Após 7 dias, a presença de uma fina camada branca sobre o sedimento indicou a presença dos filamentos de bactérias deslizantes oxidantes de enxofre nas amostras das Lagoa de Araruama e de Itaipu. Amostras da área do sedimento onde elas se encontravam foram cuidadosamente retiradas, com uma espátula e, com o auxílio de um estereomicroscópio e agulhas, os filamentos foram coletados da superfície do sedimento e suspensos em água da respectiva lagoa previamente filtrada em membrana Millipore ( $0,22\ \mu\text{m}$ ).

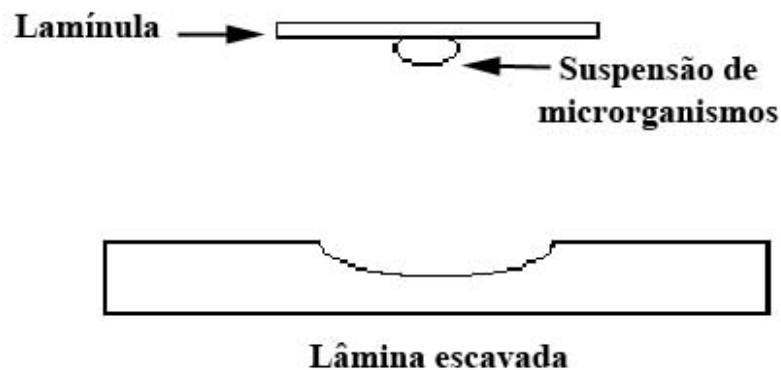
### 3.3 Microscopia de luz e Vídeo Microscopia

Os tricomas presentes nas amostras foram preparados pela técnica da gota pendente (Figura 8) para análise de seus movimentos e determinação da velocidade de deslizamento, quando em contato com uma superfície sólida lisa.

A observação foi feita com um microscópio Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Alemanha) e acessórios para contraste de fase e contraste interferencial diferencial de Nomarski. As imagens obtidas foram digitalizadas através de um sistema de análise de imagens (analySIS<sup>®</sup>, SIS GmbH) e gravadas em fitas de vídeo, para posterior digitalização e aquisição de imagens, através do programa Studio 8 ATI, versão 8.0 (Pinnacle Systems).

Para determinação das medidas celulares e distribuição dos diâmetros entre as populações, tanto de *Beggiatoa* quanto de *Thiovulum*, as amostras de bactérias foram fixadas em formaldeído a 4% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2), em água da lagoa e observados em um microscópio Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Alemanha) e acessórios para contraste de fase e contraste interferencial diferencial de Nomarski. As imagens obtidas foram digitalizadas através de um sistema de análise de imagens (analySIS<sup>®</sup>, SIS GmbH) e as medidas foram realizadas com a utilização das ferramentas implementadas pelo *software*.

Os dados relativos aos diâmetros foram plotados em histogramas através do programa Origin Pro 8 (versão 8.0). Foram medidos 799 filamentos estreitos e 3094 filamentos largos.



**Figura 8:** Esquema da técnica de gota pendente.

### **3.4 Microscopia de Fluorescência**

Para estimar o tamanho das células individuais das bactérias filamentosas foi utilizado o corante fluorescente lipofílico FM<sup>®</sup> 1-43 (5 µg/mL), que delimita a membrana das células bacterianas e torna possível a observação do contorno das células individuais. Os filamentos foram previamente fixados em formaldeído 4% e visualizados em um microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Alemanha), utilizando uma lâmpada HBO de 100W e os cassetes de filtro para fluoresceína (BP 450-490/LP 515) e para DAPI (G 365/LP 420).

### **3.5 Microscopia Confocal a Laser**

Com o objetivo de verificar a localização dos grânulos de enxofre elementar e a presença dos vacúolos internos, os tricomas foram previamente fixados em formaldeído 4%, corados com o corante fluorescente FM<sup>®</sup> 1-43 e preparados pela técnica de gota pendente (Figura 7), para preservar a estrutura dos filamentos. Os filamentos foram observados através do microscópio confocal a laser LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging) com laser de argônio a 488 nm. Cada imagem foi feita em um plano XY e múltiplas seções XY foram feitas ao longo da profundidade Z do filamento, em intervalos de 1 µm.

### **3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As amostras foram fixadas e pós-fixadas conforme descrito para MET convencional. Então, foram metalizadas com ouro em um aparelho Balzers Inc. e observadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310.

A fratura a seco foi realizada conforme descrito em BOZOLLA & RUSSEL (1992). Os filamentos foram fixados conforme descrito anteriormente, lavados (2X) em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) em água filtrada da lagoa (0,22 µm), pós-fixada em OsO<sub>4</sub> a 1%, por 1 h, incubado em ácido tânico por mais 1 h. A desidratação foi realizada em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100% - 2x), com intervalos de 15 minutos entre as trocas. As amostras foram secas em capilares de vidro pelo método de ponto crítico de CO<sub>2</sub>, em um aparelho Balzers CPD 030, e posteriormente levadas ao

estereomicroscópio para captura dos filamentos. Os filamentos foram aderidos a uma fita dupla-face, a qual estava colada no suporte de alumínio para MEV. Então, a fita adesiva foi delicadamente pressionada sobre a superfície do espécime e desgrudada para a retirada das camadas superiores da amostra. Após a fratura, as amostras foram metalizadas com ouro em um aparelho Balzers Inc. e observadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310.

### **3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

#### **3.7.1 Técnica de contrastação negativa**

Para a observação de bactérias inteiras ao microscópio eletrônico de transmissão, as células previamente selecionadas foram lavadas em água filtrada da lagoa (0,22  $\mu\text{m}$  – filtro Millipore), depositadas em grades revestidas com filme de formvar e carbono, lavadas em água destilada e contrastadas com uma solução de ácido fosfotúngstico 2%, pH 7,2. O excesso de contrastante foi então removido por capilaridade, com o auxílio de papel de filtro posicionado perpendicularmente em relação à grade. Estas foram secas ao ar e observadas em microscópio FEI Morgagni. As amostras dos cocos oxidantes de enxofre não foram contrastadas, foram apenas depositadas nas grades revestidas com filme de formvar e carbono, e secas ao ar.

#### **3.7.2 Rotina**

Para determinar a ultra-estrutura celular, as amostras de filamentos foram processadas em potes de vidro escavados e posteriormente observadas em microscopia eletrônica de transmissão. As células foram coletadas como descrito anteriormente, fixadas (durante a noite, a 4° C) em solução fixadora contendo glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 4% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2), em água da lagoa, previamente filtrada. Após a fixação, as bactérias foram lavadas por três vezes no mesmo tampão por mais 15 minutos, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1% em tampão cacodilato 0,1M, por mais 1 h (seguida ou não de contrastação em bloco com acetato de uranila 2%, por 1 h), no escuro. As amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% - por duas vezes), com intervalos de 15 minutos entre as trocas, e incluídas em resina epóxi, polimerizados em estufa de 60°C por 72

horas. Os blocos foram cortados em ultramicrotomo Leica LKB e as grades foram contrastadas com acetato de uranila por 20 minutos (exceto os cortes provenientes de bloco já contrastado) e citrato de chumbo por 1 minuto. As grades foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni.

### **3.7.3 Técnica de substituição a frio**

Para uma melhor preservação do envoltório celular, os filamentos foram submetidos à técnica de substituição a frio. Os tricomas foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Após 24h, a amostra foi lavada e infiltrada em concentrações crescentes de glicerol em tampão PBS 1X (1, 5, 10 e 25%; a 4°C/12h cada etapa) para a crioproteção das células. O material foi congelado através da imersão em Freon 22 líquido, refrigerado por nitrogênio líquido, por 30 segundos e então transferidos imediatamente para nitrogênio líquido.

A substituição a frio foi realizada com uma solução de infiltração (acetona super-seca, acetato de uranila 2% e glutaraldeído 1%), seguindo o seguinte ciclo: -90°C/72h, elevação de 1°C/h até atingir -35°C; -35°C/48h, elevação de 2°C/h até atingir -20°C; -20°C/24h; 4°C/24h (sistema de substituição a frio Leica EM AFS2). Posteriormente, o material foi lavado 2x com acetona super-seca, incluído e polimerizado em resina epóxi, cortados em ultramicrotomo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni.

## **3.8 Citoquímicas**

### **3.8.1 Técnica do vermelho de rutênio**

Esta técnica tem por objetivo a localização de componentes ácidos com caráter aniônico, principalmente associados à superfície celular e à matriz extracelular, e que podem interagir com o vermelho de rutênio, por esta ser uma substância catiônica.

Os filamentos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 4%, em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) contendo 0,5 mg/mL de vermelho de rutênio, posteriormente lavados por duas vezes, por 15 minutos, em tampão cacodilato contendo 0,5 mg/mL de vermelho de rutênio e pós-fixados em OsO<sub>4</sub>



1% em tampão cacodilato 0,1 M contendo 0,5 mg/mL de vermelho de rutênio, no escuro. Depois, os filamentos foram lavados (duas vezes) por 15 minutos em tampão cacodilato 0,1 M contendo 0,5 mg/mL de vermelho de rutênio, desidratados e incluídos conforme descrito anteriormente. Os cortes foram obtidos da forma previamente descrita e observados ao mesmo microscópio, sem contrastação (LUFT, 1971).

### 3.8.2 Localização de cálcio

Os íons de cálcio desempenham papel de muita importância em uma série de atividades celulares como, por exemplo, no movimento de cílios e flagelos. A proteína fibrilar oscilina, por exemplo, que está envolvida na locomoção por deslizamento de algumas espécies de cianobactérias, é dependente de cálcio.

Para a localização de sítios de afinidade por cálcio (OSCHMAN & WALL, 1972) as células foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 4%, em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) em água filtrada da lagoa (filtro 0,22  $\mu$ m, Milipore) acrescido de 5 mM  $\text{CaCl}_2$  por 2 h, a temperatura ambiente, posteriormente lavadas (duas vezes) no mesmo tampão, por 15 minutos cada lavagem, e pós-fixadas em  $\text{OsO}_4$  1% no mesmo tampão cacodilato 0,1 M acrescido de 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , no escuro. Posteriormente os tricomas foram lavados (três vezes) no mesmo tampão utilizado nas etapas anteriores, desidratados e infiltrados conforme descrito anteriormente.

Para controle da especificidade da técnica os cortes finos foram imersos em solução de EGTA 5 mM, durante 20 a 30 minutos, à temperatura de 60°C. Em seguida, foram lavados em água destilada, corados e observados ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni.

Para a técnica do ósmio-ferrocianeto de potássio (FORBES *et al.*, 1977) foram realizados os mesmos procedimentos de fixação e lavagem descritos acima. Durante a pós-fixação, os filamentos foram incubados em solução de  $\text{OsO}_4$  1%, em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) acrescido de 5 mM  $\text{CaCl}_2$  mais ferrocianeto de potássio a 0,8%, durante 2 h, no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram lavadas no mesmo tampão, sem o ferrocianeto de potássio e foi realizada a contrastação em bloco com acetato de uranila a 2%, por 2 h a temperatura ambiente. As etapas de desidratação e inclusão foram feitas como de rotina.

### **3.8.3 Método ósmio:imidazol**

Algumas células podem armazenar lipídios sob a forma de inclusões, como reserva de energia. O complexo ósmio:imidazol tem rápida penetração nas células e fornece uma maior interação da molécula de tetróxido de ósmio com lipídios insaturados, levando a uma melhor contrastação de inclusões lipídicas (SOARES, 1998).

Para o método ósmio:imidazol, os filamentos foram fixados conforme descrito acima (item 3.7.2). Após a fixação, os filamentos foram lavados no mesmo tampão por 15 minutos e em tampão imidazol 0,1 M (pH 7,5) por mais 15 minutos. A pós-fixação foi realizada em solução a 1% de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) em tampão imidazol 0,1 M por mais 1 h, no escuro, e as amostras foram lavadas (por duas vezes) no mesmo tampão. Os procedimentos posteriores (desidratação, inclusão e observação) foram realizados conforme descrito acima (ANGERMÜLLER & FAHIMI, 1982).

### **3.9 Microanálise de Raios-X**

Para a determinação da composição química das inclusões citoplasmáticas observadas nas bactérias foi utilizada a técnica analítica da microanálise de raios-X. Ambas as amostras foram observadas sem fixação. As estruturas celulares foram analisadas em um microscópio JEOL 1200 EX equipado com o sistema de microanálise Voyager, Noran ou JEOL 2000 FX, equipado com um sistema EDX Noran e Asid para o mapeamento dos elementos. Este sistema é equipado com um detector de Si(Li) e uma janela ultrafina (UTW). Os espectros foram adquiridos com tempos de detecção de 300 s (live time) e feixe de elétrons de 20 a 100 nm de diâmetro. As contagens de raios-X foram registradas pelo sistema e discriminadas em um gráfico de acordo com a energia dos raios-X emitidos.

### **3.10 Biologia Molecular**

#### **3.10.1 Técnicas moleculares**

As técnicas moleculares foram utilizadas neste estudo com o intuito de realizar a análise filogenética das bactérias filamentosas oxidantes de enxofre encontradas neste trabalho. Para esta análise foi realizada a extração do DNA total dos filamentos encontrados, seguida de amplificação do gene *rrs*, que

codifica o 16S rRNA, com iniciadores universais, clonagem da totalidade deste gene, sequenciamento e alinhamento com sequências existentes em bancos de dados para verificação do percentual de identidade genética dos tricomas. Os iniciadores utilizados durante a análise filogenética estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2** Iniciadores utilizados na análise filogenética. Bases nitrogenadas degeneradas: *R* – A ou G; *H* – A, C ou T; *W* – A ou T; *K* – G ou T. \*Iniciadores utilizados no seqüenciamento do gene *rrs*.

Iniciador	Posição relativa do iniciador no genoma de <i>E. coli</i> (5'-3')	Seqüência (5'-3')
8F	8-27	GRG TTT GAT CCT GGC TCA G
1512R	1512-1492	ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT
*519R	519-501	GWA TTA CCG CGG CKG CTG
*530F	530-546	GTG CCA GCM GCC GCG G
*1110R	1110-1095	GGG TTG CGC TCG TTG
*1114F	1114-1130	GCA ACG AGC GCA ACC C
*M13/pUC reverso	Vetor plasmidial de clonagem pTZ57R	CAG GAA ACA GCT ATG AC
*M13/pUC	Vetor plasmidial de clonagem pTZ57R	GTA AAA CGA CGG CCA GT

### 3.10.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA total, os filamentos previamente selecionados no estereomicroscópio, de acordo com o diâmetro, foram lavados em água filtrada da lagoa (0,22 µm - filtro Millipore) com utensílios estéreis para evitar contaminantes. O DNA foi extraído através de sucessivas etapas de congelamento/descongelamento a -20°C.

A extração dos DNA plasmidial de clones de *E. coli* (estirpe DH5α) contendo o inserto foi realizada com a utilização do kit de extração GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).

### 3.10.3 PCR do gene *rrs*

As reações de amplificação por PCR utilizando os iniciadores universais para o gene *rrs* foram realizadas conforme descrito por ÉDEN *et al.* (1991), visando a obtenção de um fragmento de aproximadamente 1,5 kb. Cada tubo de reação continha 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM de cada dNTP, 1 µM de cada iniciador (8F e 1512R), 0,1% BSA, 2 µL do lisado celular como DNA molde e 2,5 U da enzima *Taq* polimerase (Fermentas). Primeiramente foi realizado um 'hot-start' de 94°C/1 min, onde o tubo continha a mistura da reação sem a enzima *Taq* polimerase. Após este passo inicial a enzima polimerase foi acrescentada e deu-se início a reação de amplificação por PCR. O ciclo aplicado foi: 1x (5 min, 94°C); 35x (1 min s, 94°C; 1 min, 50°C; 2 min, 72°C); 1x (20 min, 72°C); 4°C. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4% acrescido de 1 µg/mL de brometo de etídio, a 80V, por 2 h e visualizados sob luz U.V., em comprimento de onda de 300 nm.

### 3.10.4 Clonagem e seqüenciamento dos fragmentos amplificados por PCR

Os produtos amplificados dos genes que codificam o 16S rRNA foram purificados através da utilização do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Após a purificação, os produtos foram separadamente clonados em *E. coli* DH5α utilizando-se o kit InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas), de acordo com o manual do fabricante. Após a clonagem, a presença do inserto foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% e apenas os plasmídeos com o tamanho esperado (aproximadamente 4,2 Kb), relativo à presença do inserto, foram seqüenciados.

Nas reações de seqüenciamento foram utilizados 3,2 pmol de cada iniciador, individualmente, e 100-200 ng de DNA, de acordo com a análise quantitativa em gel de agarose 1%.

### 3.10.5 Análise filogenética do gene *rrs*

As seqüências de aproximadamente 900 pb obtidas a partir da reação de seqüenciamento, com cada iniciador individualmente, foram analisadas através de seus eletroferogramas no programa BioEdit Sequence Alignment

Editor (versão 7.0.5) e editadas de acordo com a eficiência do sequenciamento. Após a edição dos fragmentos, as sequências foram re-montadas através do programa ClustalW, utilizando-se como referência a sequência mais próxima, o gene *rrs* da *Beggiatoa* sp. MS-81-6, que foi o primeiro hit obtido no alinhamento com o BLAST-N realizado no sítio do National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) com o banco de dados do Genbank.

Após a re-montagem foram obtidas duas sequências consenso diferentes, oriundas de dois clones, e foi realizada uma busca com a ferramenta Sequence Match (*SeqMatch*), do Ribosomal Database Project (RDP Release 10, Update 12), que permite uma identificação de sequências de referência próximas, utilizando diferentes filtros, como por exemplo: estirpe-tipo, fontes (isoladas ou não-cultivadas), tamanho do fragmento depositado e qualidade da sequência. Neste caso, foram escolhidos os parâmetros: estirpe-tipo ou não, tanto isolados quanto não-cultivados, sequências com tamanho igual ou superior a 1200 pb, sequências de boa qualidade e sequências consistentemente alocadas em grupos taxonômicos bacterianos baseado na classificação pela análise do gene que codifica o16S rRNA.

Para a determinação da posição taxonômica das sequências obtidas em relação às sequências de referência recuperadas do RDP, todos os *hits* obtidos a partir do *SeqMatch* foram alinhados juntamente com as duas sequências de Araruama (Araruama I e II) com o software Clustal X (THOMPSON, HIGGINS & GIBSON, 1997) e uma árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbour-Joining (SAITOU & NEI, 1987), usando a máxima verossimilhança composta entre as sequências como valor de distância. A construção da árvore foi realizada com o software MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007).

Além da comparação com sequências de referências do RDP, também foi realizada uma busca por sequências próximas no depositadas no grande banco de dados do NCBI, uma vez que este banco é mais amplo. Para tal, as sequências de Araruama foram alinhadas através do *software* BLAST-N e os primeiros 40 hits obtidos foram alinhados juntamente com as duas sequências de Araruama (Araruama I e II) através do software Clustal X (THOMPSON, HIGGINS & GIBSON, 1997) e outra árvore filogenética foi construída como descrito acima.

Para avaliar a posição filogenética das sequências obtidas de Araruama em relação a outros tricomas estreitos marinhos foi realizada uma terceira análise, apenas com as sequências referentes a bactérias filamentosas oxidantes de enxofre. Sendo assim, foram buscadas no banco de dados do NCBI sequências superiores a 1200 pb relativas a este grupo bacteriano, de forma que tivessem um número de bases próximo ao das sequências geradas neste trabalho. As sequências foram alinhadas juntamente com as duas sequências de Araruama (Araruama I e II) com o software Clustal X (THOMPSON, HIGGINS & GIBSON, 1997) e uma árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbour-Joining (SAITOU & NEI, 1987), usando o número de diferenças entre as seqüências como valor de distância. A construção da árvore foi realizada com o software MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007). O principal critério utilizado para identificar bactérias filamentosas pertencentes ao gênero *Beggiatoa* é a morfologia, levando-se em conta o diâmetro do tricoma para classificá-lo como estreito ou largo. Como já foi dito anteriormente, até então se tem distinguido estes dois tipos de filamento, sendo o estreito composto por tricomas entre 2 e 5  $\mu\text{m}$ , e o largo por tricomas vacuolados acima de 9  $\mu\text{m}$  (AHMAD, KALANETRA & NELSON, 2006).

### **3.11 Análise das populações de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre**

#### **3.11.1 Amostragem**

As coletas foram realizadas em diferentes localizações da Lagoa de Araruama (Praia Seca, CNA - região próxima ao Canal da Companhia Nacional de Álcalis, e Praia de Iguaba Grande) no intuito de avaliar a distribuição das populações de bactéria filamentosas oxidantes de enxofre. Foram utilizados amostradores de 20 cm de comprimento x 4 cm de diâmetro interno.

No momento da coleta foi realizado o fracionamento de cada amostra (água e os dois primeiros centímetros do sedimento); de cada local foi feita a amostragem composta, misturando-se cada fração proveniente de 3 amostradores distintos. Imediatamente, as frações foram colocadas no gelo afim de que fosse mantida a estrutura da comunidade microbiana. Além disso, foram levados amostradores para o laboratório para realização de outros experimentos.

### 3.11.2 Biovolume relativo das bactérias filamentosas oxidantes de enxofre

A estimativa do biovolume foi realizada por fração, de acordo com Preisler *et al.* (2007). Todos os filamentos e cocos presentes na água superficial (5 mL) foram contados, de cada fração foi feita uma amostragem de 300 a 500 mg, a qual foi suspensa em 10 mL formaldeído 4%. A partir de 300 mg desta suspensão, os filamentos e cocos foram separados com o auxílio de um estereomicroscópio e medidos por microscopia. O cálculo do biovolume foi realizado de acordo com HILLEBRAND *et al.* (1999), que definiu modelagens geométricas para estimativas de biovolumes em cianobactérias filamentosas, seguindo a fórmula  $V = \pi.r^2.h = \pi/4.d^2.h$ . O biovolume total, por fração, foi estimado através da soma dos biovolumes determinados para cada filamento, multiplicado pelo volume de sedimento amostrado.

O biovolume relativo dos filamentos oxidantes de enxofre do gênero *Beggiatoa* sp. foi obtido a partir da medida dos diâmetros e comprimentos de cada filamento seguida do cálculo, utilizando-se a fórmula para forma cilíndrica, como descrito acima. A partir destes valores, assumindo a densidade específica para bactérias deste gênero de  $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  (HINCK *et al.*, 2007; PREISLER *et al.*, 2007), a biomassa total de *Beggiatoa* sp. encontrada em cada fração de sedimento analisada e na coluna d'água foi estimada.

O acompanhamento da frequência de *Beggiatoa* sp. no intervalo entre as coletas foi feito apenas em Cabo Frio, por este ter sido o local onde, visualmente, foi continuamente encontrada a maior quantidade de filamentos, de forma a aumentar a probabilidade de se perceber qualquer tipo de mudança na estrutura da população. Os dados da frequência mostram a distribuição dos filamentos ao longo do gradiente, independente da biomassa, ou seja, é o reflexo do número de filamentos por amostragem.

## **4 Resultados**

### **4.1 Estrutura das bactérias filamentosas oxidantes de enxofre**

#### **4.1.1 Medidas celulares das populações de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre**

Aproximadamente sete dias após a coleta, foi possível observar a formação de tapetes de bactérias filamentosas incolores oxidantes de enxofre em amostras de ambas as lagoas (Prancha 1, Figuras 9 A e B). A análise por microscopia de luz com contraste diferencial interferencial (DIC) ou contraste de fase mostrou que todos os tricomas contêm inclusões de enxofre, cuja presença é resultante da reação de oxidação do sulfeto e é o que torna indubitável a identificação destes filamentos; também foi possível observar que existem dois tipos de filamentos: estreito e largo (Prancha 1, Figuras 9C e 10; Prancha 2, Figuras 11 e 12). Os tricomas possuem diâmetros variados (2,4 - 33  $\mu\text{m}$ ), as células individuais dos filamentos de ambas as lagoas variou entre 4,8 e 13,2  $\mu\text{m}$  (comprimento médio = 9,57  $\mu\text{m}$ ; desvio padrão = 2,94) e a locomoção ocorre por deslizamento.

A análise em conjunto dos diâmetros dos filamentos obtidos a partir de biofilmes característicos de ambas as lagoas (Lagoa de Araruama e Lagoa de Itaipu) deu origem a um histograma (Prancha 1, Figura 10). É possível perceber, na análise conjunta das duas lagoas, que existem 3 populações de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre, tendo por princípio que a característica que separa os dois tipos é a presença/ausência de vacúolo intracitoplasmático. Uma população é formada pelos filamentos estreitos (2,4 a 6,5  $\mu\text{m}$ ), outra por filamentos largos entre 6,5 e 12,3  $\mu\text{m}$ , além de uma terceira, formada pelos filamentos mais largos. A distinção entre os filamentos de diâmetros próximos em estreitos e largos foi realizada baseada na presença/ausência de vacúolo intracitoplasmático. Os resultados das análises mostraram um diâmetro médio de filamentos estreitos de 4,4  $\mu\text{m}$  (desvio padrão = 1,08; amostragem = 2,4 a 6,5  $\mu\text{m}$ ,  $n = 799$ ) enquanto o diâmetro médio das duas populações de filamentos largos foi de 13,54  $\mu\text{m}$  (desvio padrão = 8,22; amostragem = 6,5 a 33;  $n = 3094$ ). O comprimento dos filamentos variou de 10  $\mu\text{m}$  a mais de 30 mm.



A análise distinta das lagoas mostrou que tanto a Lagoa de Itaipu quanto a Lagoa de Araruama parecem ter duas populações de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre, compostas por filamentos de diferentes diâmetros (amostragem = 6,4 a 33  $\mu\text{m}$  e 2,4 a 32  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (Prancha 2, Figuras 11 e 12). A diferença entre as populações das duas lagoas está na composição e abundância de cada população; apesar de existirem duas populações na Lagoa de Itaipu, estas são formadas apenas por filamentos vacuolados, enquanto em Araruama, a população que contém os filamentos estreitos parece ser mais abundante.

#### **4.1.2 Motilidade e estrutura do envelope celular**

Os tricomas estreitos se movem por deslizamento em velocidade média de 3,0  $\mu\text{m/s}$  ( $n = 30$ ) e os largos, à velocidade média de 1,5  $\mu\text{m/s}$  ( $n = 15$ ). Este movimento parece ser desenvolvido a partir de estruturas semelhantes às que compõem os motores moleculares em cianobactérias filamentosas (HOICZYK & BAUMEISTER, 1995), conforme descrito a seguir.

Estruturas fibrilares longitudinais foram encontradas na superfície de filamentos observados ao MET (Prancha 3, Figuras 13A e B), tanto a partir de cortes ultrafinos de amostras processadas através de metodologias citoquímicas, quanto de tricomas inteiros, sem processamento, contrastados negativamente com PTA a 2%.

A microscopia eletrônica também permitiu a observação de possíveis canais trans-membrana (Prancha 3, Figura 13C), através de processamento de rotina, por onde ocorreria a extrusão do muco. Estes canais, presentes na região do septo, formariam o complexo de poros cruzados. O muco, provavelmente composto por polissacarídeo (Prancha 3, Figura 13D), foi observado através da contrastação negativa dos tricomas após 10 minutos de deslizamento sobre grades cobertas com filme de formvar e carbono, observada por microscopia eletrônica de transmissão. Houve a formação de uma trilha, possivelmente constituída de polissacarídeo, que é observada a partir da região do septo, entre as células individuais que constituem o filamento, com uma clara indicação da sua direção.

Os cortes finos obtidos no processamento para microscopia eletrônica de transmissão dos filamentos estreitos e largos mostraram uma estrutura de

envelope multi-camadas bastante complexa (Prancha 4, Figuras 14A e B). O envelope celular dos tricomas estreitos (Prancha 4, Figura 14A) consiste em cinco camadas (interna para externa: *a* – 2 nm, *b* – 2 nm, *c* – 3,4 nm, *d* – 3,3 nm, *e* – 3,6 nm).

O envelope celular dos tricomas largos é composto por quatro camadas, aqui denominadas *w*, *x*, *y* e *z*, respectivamente, do interior para o exterior. A membrana citoplasmática medindo aproximadamente 3,1 nm é coberta por uma camada '*w*', de aproximadamente 3,5 nm. Existem três outras camadas envolvendo o filamento, sendo que a mais externa '*z*' é a mais espessa, com uma média de 11,5 nm de espessura (Prancha 4, Figura 14B).

Em ambos os casos, o septo é formado pela membrana citoplasmática em conjunto com a camada mais interna (*a* e *w*, respectivamente) (Prancha 4, Figura 14C). A presença do muco extracelular também foi observada (Prancha 4, Figura 14D) em tricomas processados para microscopia eletrônica de transmissão, através da metodologia tetróxido de ósmio-ferrocianeto de potássio.

#### **4.1.3 Corpos de inclusão e grânulos intracitoplasmáticos**

Através da microscopia óptica com contraste interferencial diferencial foi possível observar que a quantidade e distribuição dos grânulos de enxofre não são uniformes; esta varia entre os filamentos estreitos e largos (Prancha 5, Figuras 15 e 16), assim como ocorre com os grandes vacúolos intracitoplasmáticos dos filamentos largos (Prancha 5, Figuras 16 A-D).

Neste estudo foi realizado o corte seriado através da microscopia confocal de varredura a laser (MCL) e foi possível observar que as inclusões de enxofre estão localizadas na periferia dos filamentos, provavelmente no espaço periplásmico (Prancha 6, Figura 17F). Através da epi-iluminação com reflexão no microscópio confocal a laser (Prancha 6, Figuras 17B e D), foi possível identificar com mais clareza a distribuição do enxofre.

Através da MCL de filamentos vivos foi possível observar o extravasamento do conteúdo celular durante o processo de divisão, no local da formação da célula de sacrifício (necrídia) (Prancha 6, Figura 17E). Os grandes vacúolos, que provavelmente contêm nitrato, observados nos tricomas largos

tanto por DIC quanto por MCL parecem ter algum tipo de envoltório que separa o seu conteúdo do meio intracelular.

Por microanálise de raios-X (Prancha 7, Figuras 18 e 19), foi possível detectar ainda outro tipo de inclusão nos filamentos estreitos, ricos em polifosfato (Prancha 7, Figura 18B); além de ter sido possível confirmar a presença do enxofre nos grânulos eletrólucos nos filamentos estreitos e largos (Prancha 7, Figuras 18C, 19A e B). A produção de PHB parece ser uma característica exclusiva das estirpes estreitas heterotróficas de água doce (STROHL, HOWARD & LARKIN, 1978).

A microscopia eletrônica de varredura dos tricomas fraturados mostrou que a estrutura interna dos filamentos consiste de citoplasma, diferentes inclusões e o septo entre as células individuais (Prancha 8, Figura 20A). Os grandes vacúolos intracitoplasmáticos não foram observados, provavelmente porque seu conteúdo foi extraído durante o processamento de desidratação com etanol.

Através da microscopia eletrônica de transmissão de amostras preparadas pelo procedimento de rotina e para metodologias de citoquímica foi possível mostrar a complexa estrutura dos tricomas (Prancha 8, Figuras 20B - G).

O processamento de rotina evidenciou algumas estruturas globulares, eletrondensas, não-associadas à membrana citoplasmática (Prancha 8, Figura 20B), provavelmente consistindo nos grânulos de polifosfato observados na célula inteira mostrados anteriormente (Prancha 7, Figuras 18A e B). Também pelo procedimento de rotina foi possível observar a estreita relação dos glóbulos de enxofre, eletrólucos, com a membrana citoplasmática (Prancha 8, Figura 20C).

As amostras preparadas pelo método ósmio-imidazol corroboraram a evidência de que as inclusões de enxofre estão envoltas por único envelope eletrondenso, localizado dentro de invaginações da membrana citoplasmática e estreitamente associada a ela (Prancha 8, Figura 20D).

A citoquímica para detectar cálcio mostrou um grande número de partículas redondas densas e invaginações de membrana. Localizam-se periplasmicamente e mostraram um aspecto bastante distinto; são levemente eletrondensas e, aparentemente, seu conteúdo sofreu algum tipo de reação

química que formou estruturas radiais (Prancha 8, Figura 20E). Além disso, podemos observar a presença de outras inclusões, também periplásmicas, eletrondensas, a partir de amostras processadas com a utilização de tetróxido de ósmio/ferrocianeto de potássio e tetróxido de ósmio/vermelho de rutênio. As duas citoquímicas têm diferentes objetivos, mas ambas podem evidenciar a presença de grânulos do polímero liberado durante a locomoção por deslizamento, provavelmente de caráter ácido (Prancha 8, Figuras 20F e G).

Toda a análise estrutural indica que os filamentos encontrados nas lagoas de Araruama e Itaipu pertencem ao gênero *Beggiatoa*, uma vez que possuem as características morfológicas e estruturais necessárias para a identificação adequada.

#### 4.2 Análise filogenética

A partir das clonagens do gene *rrs* dos tricomas não-vacuolados encontrados na Lagoa de Araruama, apenas 2 clones dentre os 10 analisados possuíam insertos distintos relacionados a *Beggiatoa* sp. Já as clonagens realizadas a partir da amplificação do gene *rrs* dos tricomas vacuolados não resultaram na obtenção de insertos relacionados a *Beggiatoa* sp. De todas as clonagens realizadas, 47 clones foram obtidos, dentre os quais apenas 4 clones continham inserto, sendo todos relativos a *Pseudoalteromonas* sp.

A árvore filogenética obtida a partir da análise das sequências dos filamentos não vacuolados com os hits do SeqMatch RDP (Prancha 9, Figura 21) mostrou claramente dois grandes grupos bem distintos (A e B), sendo um deles formado apenas pelas bactérias filamentosas oxidantes de enxofre e o outro, por bactérias encontradas em ambientes marinhos.

O grupo B, formado pelas bactérias filamentosas oxidantes de enxofre é composto por tricomas do gênero *Beggiatoa* e outras três amostras de bactérias filamentosas vacuoladas encontradas em ambientes marinhos, que não pertencem a este gênero. As sequências obtidas neste trabalho (*Beggiatoa* sp. Araruama I e II) agruparam-se com a estirpe MS-81-6, encontrada em ambiente marinho, não-vacuolada, com diâmetro de 4-5  $\mu$ m, com o valor de 'bootstrap' de 100%. A outra estirpe estreita marinha MS-81-1c formou um ramo distinto, como foi visto por AHMAD, KALANETRA & NELSON (2006).

O resultado observado através da análise com os primeiros 40 hits obtidos com o programa BLAST-N apresentou uma topologia semelhante à obtida com utilizando somente as sequências de referência do RDP. A árvore filogenética obtida (Prancha 10, Figura 22), mostra dois grandes grupos (C e D), o grupo C composto por várias sequências referentes a *Gammaproteobacterias* de ambiente marinho, em sua maioria; e o grupo D, formado pelas bactérias filamentosas oxidantes de enxofre. Este possui o 'bootstrap' no valor de 98%, e foi dividido em dois grupos, com um valor de 'bootstrap' de 78%, separando as sequências relativas aos filamentos vacuolados e não-vacuolados. Mais uma vez, como foi dito anteriormente, a sequência relativa ao filamento 'estrito' vacuolado encontrado em ambiente hipersalino foi agrupada juntamente com outras bactérias filamentosas vacuoladas, de diâmetros maiores (Monterey Canyon, 65-85  $\mu\text{m}$ ; Bay of Concepción, 35-40  $\mu\text{m}$ ; White Point VAF, 10-112  $\mu\text{m}$ ). As sequências de Araruama ficaram agrupadas com 100% de 'bootstrap' em um ramo dentro deste grupo, juntamente com a estirpe de *Beggiatoa* sp. MS-81-6, estreita marinha oxidante de enxofre. Dentro deste ramo formado pelas sequências de Araruama, Araruama II agrupou com MS-81-6 em 80%.

A árvore filogenética obtida pela análise das sequências referentes apenas a *Beggiatoa* sp. confirmou a presença dos filamentos estreitos, ou seja, não-vacuolados, encontrados na Lagoa de Araruama como pertencentes ao gênero *Beggiatoa*, agrupadas com as mesmas sequências observadas nas outras árvores (Prancha 11, Figura 23). A topologia da árvore filogenética gerada nesta análise mostra a existência de dois grandes grupos: marinho (grupo I) e água doce (grupo II). Todos os filamentos vacuolados oxidantes de enxofre permaneceram juntos, dentro do grande grupo de bactérias filamentosas marinhas, contendo os filamentos pertencentes ao gênero *Beggiatoa* e os filamentos vacuolados não envolvidos no ciclo do nitrato (White Point e Escanaba Trough). Estas sequências se encontram em um ramo distinto das relacionadas ao acúmulo interno de nitrato. O outro grande grupo é formado pelas *Beggiatoa* sp. de água doce, com 70% de valor de 'bootstrap', apenas com filamentos estreitos. Um sub-grupo consistente (grupo III) aparece nas bactérias filamentosas marinhas, composto pelas *Beggiatoa* marinhas estreitas. À exceção das sequências referentes ao Lago Chiprana (*Beggiatoa*

sp. *Chiprana* e *Beggiatoa* sp. de cultura de enriquecimento 1124), que são provenientes de filamentos vacuolados, todas as outras sequências referem-se a filamentos não- vacuolados, com um robusto valor de 'bootstrap' de 92%. As sequências relativas aos filamentos de Araruama ficaram agrupados em 100%, tendo Araruama I formado um ramo distinto, juntamente com MS-81-6, com 85% de 'bootstrap'.

Os resultados obtidos pelas análises filogenéticas corroboram toda a identificação e caracterização estrutural, confirmando que os filamentos estreitos encontrados na Lagoa de Araruama, Rio de Janeiro, Brasil, pertencem realmente ao gênero *Beggiatoa*.

### **4.3 Avaliação da densidade populacional das bactérias filamentosas do gênero *Beggiatoa***

#### **4.3.1 Distribuição de filamentos de *Beggiatoa* sp. em diferentes profundidades em sedimento da Lagoa de Araruama**

No geral, a biomassa de filamentos detectada nas amostras coletadas em setembro foi superior à de janeiro. No mês de setembro/2008 a distribuição dos filamentos foi semelhante em ambos os pontos (Prancha 12, Figura 24A), tendo sido encontrada a maior biomassa na coluna d'água. Houve um decaimento da população no primeiro centímetro de sedimento, seguido de um aumento no segundo centímetro, onde a concentração do oxigênio é, provavelmente, menor. Apesar de existir mais *Beggiatoa* sp. no sedimento da região de Cabo Frio (CNA), a distribuição da população segue o mesmo padrão.

No mês de janeiro/2009 (Prancha 13, Figura 25A), a distribuição da população seguiu o mesmo padrão nas amostras de Praia Seca, mas nas da CNA foi diferente. Na coluna d'água foi detectada uma biomassa superior em Praia Seca do que na CNA, ao contrário do que foi encontrado na amostra anterior. Além disso, na CNA a maior quantidade de biomassa foi detectada na faixa de dois centímetros, enquanto que em Praia Seca a coluna d'água continha mais filamentos. Também foram amostrados sedimento e água de Iguaba Grande, onde foram observados os primeiros filamentos oxidantes de enxofre, em 2005, mas neste ponto de coleta a contagem foi de zero.

Comparando os dados de biomassa com os dados de frequência, no mesmo período, é possível perceber que há algumas diferenças, no sentido de que a maior biomassa não corresponde exatamente à maior frequência de filamentos (Prancha 12, Figura 24B e Prancha 13, Figura 25B). A maior frequência de tricomas na coluna d'água e no segundo centímetro de profundidade do sedimento em Praia Seca (Setembro/2008), com relação ao encontrado em Cabo Frio, comparativamente com a biomassa, sugere que a população de *Beggiatoa* sp. em Cabo Frio é composta, nestas amostragens, por filamentos vacuolados na maioria. No caso da coleta de Janeiro/2009, o mesmo parece acontecer na coluna d'água em Cabo Frio; provavelmente a maioria da população era composta por tricomas vacuolados.

Na figura 26 (Prancha 14) é possível observar, através do gráfico de frequência, que os filamentos não possuem uma distribuição homogênea, nem com relação à localização no ambiente, nem com a época da coleta, a não ser no mês de dezembro. Em outubro, os filamentos pareciam estar na coluna d'água, em sua maioria e, em novembro, no sedimento.

## 5 Discussão

Este trabalho foi realizado com o intuito de caracterizar e diferenciar as bactérias filamentosas oxidantes de enxofre encontradas em lagoas costeiras do Estado do Rio de Janeiro. Até então, não haviam sido evidenciadas as diferenças ultra-estruturais existentes entre os dois tipos de bactérias filamentosas descritos na literatura, estreito e largo. Através de diferentes técnicas de microscopia, tanto microscopia de luz quanto eletrônica, foi possível caracterizar e distinguir os dois tipos, mostrando que se dividem em bactérias filamentosas vacuoladas ou não-vacuoladas. Além disso, a análise filogenética mostrou que estes filamentos, de acordo com a análise morfológica, pertencem ao gênero *Beggiatoa*. A análise populacional mostrou que os filamentos de *Beggiatoa* da Lagoa de Araruama migram ao longo da coluna d'água e para dentro do sedimento e a análise morfológica da população de bactérias componentes dos véus brancos encontrados em microcosmos, sem presença evidente de *Beggiatoa*, mostrou que pertencem ao gênero *Thiovulum*, que também é oxidante de enxofre e encontrado em ambientes estratificados, onde a presença do sulfeto é detectável.

### 5.1 Caracterização morfológica das bactérias filamentosas oxidantes de enxofre encontradas em lagoas costeiras do Rio de Janeiro

#### 5.1.1 Distribuição dos diâmetros entre as populações de *Beggiatoa* spp. e locomoção

A constituição dos tapetes observados nas amostras foi muito variável, de acordo com a coleta. Às vezes os tapetes eram formados por filamentos estreitos e largos, apenas estreitos ou largos em sua maioria, sendo esta última composta também por alguns filamentos estreitos. Os histogramas foram baseados em várias amostragens, em conjunto, com o objetivo único de avaliar a constituição das populações, sem inferência de riqueza de cada uma. As três populações encontradas, quando analisadas as duas lagoas, representam amostras dos filamentos deslizantes oxidantes de enxofre estreitos e largos encontrados em diferentes tapetes de ambas as lagoas. Na verdade, as duas primeiras populações se separam apenas pela presença do vacúolo intracitoplasmático encontrado nos filamentos a partir de 7,0  $\mu\text{m}$ . O estudo realizado por AHMAD, KALANETRA & NELSON (2006), que tinha por objetivo



definir a raiz filogenética das bactérias sulfurosas vacuoladas, mostrou que os filamentos de *Beggiatoa* sp. descritos até então como largos-vacuolados tinham um diâmetro mínimo de 9  $\mu\text{m}$  e estavam agrupados separadamente dos filamentos não-vacuolados, estreitos, com diâmetro máximo de 5  $\mu\text{m}$ . Em 2007, HINCK *et al.* relataram a presença de um filamento vacuolado no lago Chiprana (Espanha), o qual denominaram estreito, pelo fato de a população compreender filamentos de diâmetros entre 6 e 8  $\mu\text{m}$ , que estão entre o diâmetro máximo encontrado até então em filamentos “estreitos” e o mínimo, nos “largos”. Além disso, baseado na análise filogenética do gene *rrs*, os tricomas foram agrupados juntamente com a estirpe marinha MS-81-6, composta por tricomas entre 2 e 5  $\mu\text{m}$ .

Na realidade, o único critério que parece separar realmente as populações, é a presença ou ausência dos vacúolos intracitoplasmáticos. Uma vez que a separação prévia dos diâmetros relativos aos tricomas vacuolados ou não, baseada na observação ao microscópio realizada neste estudo, foi crucial para a separação das três populações, é aceitável dizer que a denominação “estreito” ou “largo” não é adequada. É difícil estipular que a diferença de 1  $\mu\text{m}$  seja suficiente para que o filamento não seja mais designado “estreito”, mas é compreensível que existam bactérias filamentosas deslizantes oxidantes de enxofre com um mesmo diâmetro, que sejam agrupadas separadamente pela presença/ausência de vacúolos intracitoplasmáticos.

### **5.1.2 Estrutura do envelope celular e movimento**

A determinação da velocidade média dos tricomas foi realizada a partir da filmagem de tricomas em movimento retilíneo paralelo à tela de observação, tendo sido contabilizados apenas deslizamentos contínuos por um período mínimo de 5 s. O tempo mínimo de deslizamento não foi maior pela dificuldade de visualização do movimento retilíneo, já que as bactérias tendem a se enroscar e formar laços. Apesar de a amostragem parecer pequena, os resultados estão de acordo com dados previamente publicados relativos às velocidades médias de deslizamento de tricomas com diâmetros aproximados (NELSON *et al.*, 1989; HINCK *et al.*, 2007; KAMP, RØY & VOGT, 2008), validando nossa pequena amostragem.

Como já foi descrito na introdução deste trabalho (item 1.3), o modelo de motor molecular responsável pela locomoção por deslizamento presente em algumas cianobactérias filamentosas envolve um conjunto de fatores: a presença de canais trans-peptidoglicanos, por onde seria exsudado um polímero; a liberação deste polímero, que seria responsável pela aderência dos tricomas a uma superfície; e a presença de fibras contráteis, responsáveis pelo deslizamento, propriamente dito, do filamento sobre a superfície. Neste trabalho, a microscopia eletrônica de transmissão mostrou algumas estruturas fibrilares na superfície dos tricomas, tanto estreitos quanto largos, similares às fibrilas lineares longitudinais foram encontradas na estirpe B15LD de *B. alba* (STROHL, HOWARD & LARKIN, 1978). Estes dados estão de acordo com a estrutura do envelope de algumas cianobactérias filamentosas deslizantes, onde as fibrilas são parte de um motor molecular responsável pela locomoção por deslizamento.

Além disso, foi possível observar a extrusão de um denso polímero durante o movimento por deslizamento e a presença de possíveis canais trans-peptidoglicanos, constituindo o motor molecular destas bactérias e mostrando ser este semelhante ao descrito para cianobactérias filamentosas. O envelope celular dos filamentos estreitos consiste em cinco camadas como descrito para *B. alba* B15LD, uma estirpe cultivada de água doce sobre a qual foi realizado o estudo sobre ultra-estrutura do envelope (STROHL, HOWARD & LARKIN, 1982).

As diferenças observadas entre as espessuras dos filamentos estreitos e *B. alba* (envelope composto por cinco camadas, onde existem duas estruturas tri-laminares, com 10-12 nm cada, camadas *b* e *d*) provavelmente se devem às técnicas utilizadas. A estrutura do envelope da *Beggiatoa* B15LD, de água doce, foi definida através de citoquímica com tetróxido de ósmio/vermelho de rutênio, o que pode causar algumas mudanças na espessura da membrana ou do envelope. Neste estudo foi utilizada a técnica de substituição a frio, sem pós-fixação com tetróxido de ósmio, provavelmente evitando qualquer tipo de precipitação.

NELSON, WIRSEN & JANNASH (1989) observaram cortes ultrafinos de uma *Beggiatoa* vacuolada, mas não exploraram as diferenças existentes entre os dois tipos de filamento destas bactérias; foi apenas sugerido que a parede

celular multicamadas seria similar à descrita para *Thioploca*, conseqüentemente diferente da descrita para *B. alba*, estreita e de água doce (STROHL, HOWARD & LARKIN, 1982). No presente estudo foi possível mostrar que a estrutura do envelope celular dos tricomas vacuolados é realmente diferente, o envelope celular destes tricomas é composto por 4 camadas, ao invés de 5 camadas, como descrito para os filamentos estreitos.

Em 2006, KAMP, STIEF & SCHULZ-VOGT estudaram a capacidade de uma *Beggiatoa* sp. estreita, de água doce, de realizar a oxidação anaeróbica do sulfeto utilizando o nitrato como aceptor de elétrons alternativo ao oxigênio. Esta estirpe foi isolada em um ambiente rico em nitrato (Aarhus, Dinamarca), mantida em cultura de enriquecimento em laboratório e com diâmetro médio de 3 µm. Os resultados obtidos mostraram que estes filamentos moveram em direção ao ambiente rico em nitrato e que, neste micronicho, foram capazes de oxidar uma quantidade bem maior de sulfeto. Como não foram detectados vacúolos de nitrato em filamentos estreitos, a hipótese é de que a estocagem seja citoplasmática. Logo, a presença dos vacúolos intracitoplasmáticos parece estar ligada somente aos filamentos largos, não a um filamento estreito com capacidade para acumular nitrato; o que reforça a idéia de que, na realidade, os dois tipos de *Beggiatoa* sp. são vacuolado e não-vacuolado, ao invés de largo e estreito. A capacidade de atingir maiores diâmetros parece ser intrínseca às bactérias marinhas vacuoladas, justamente devido à capacidade de estocar quantidades altíssimas de nitrato, ocorrendo em vários gêneros bacterianos (*Beggiatoa*, *Thioploca* e *Thiomargarita*).

### **5.1.3 Corpos de inclusão, grânulos e vacúolos intracitoplasmáticos**

A presença dos glóbulos de enxofre é o que torna indubitável a identificação dos filamentos de bactérias deslizantes oxidantes de enxofre. Nossas observações dos diferentes tamanhos e quantidades de glóbulos por filamento indicam diferentes estados metabólicos, como foi observado e concluído por STROHL, GEFERS & LARKIN (1981) quando estudaram as estirpes cultivadas de *B. alba* L1401-13, B25RD e B18LD. Uma vez que esta característica foi detectada em filamentos provenientes de cultura, no ambiente a variação poderia ser ainda maior.

A epi-iluminação com reflexão no microscópio confocal a laser permitiu constatar a distribuição periférica dos glóbulos de enxofre nos filamentos vacuolados, tal como PASTERIS et al. (2001) que usou a mesma ferramenta para determinar a distribuição espacial (3-D) de precipitados de enxofre altamente refratáveis em microrganismos intactos, com uma resolução espacial de  $\leq 0.5 \mu\text{m}$ . A microscopia eletrônica de transmissão confirmou este dado tanto por visualização de cortes ultrafinos, quanto por microanálise de raios-X.

Neste estudo, os glóbulos de enxofre foram observados nos cortes ultrafinos como estruturas eletrólucidas, pois o enxofre é removido durante a desidratação. STROHL, GEFERS & LARKIN (1981) reportaram que os envelopes consistem de uma única camada protéica, com 4-5 nm de espessura quando utilizaram um protocolo modificado de Ryter-Kellerberger e o protocolo de fixação com glutaraldeído-vermelho de rutênio. A precipitação observada nas micrografias obtidas de amostras processadas pelo método ósmio-imidazol, que torna a espessura dos envelopes maior, pode ser devido à presença de lipídios na constituição do envelope dos grânulos de enxofre, já que esta citoquímica tem por objetivo detectar lipídeos insaturados. Esta característica vai de encontro ao que foi visto até então, uma vez que os envelopes de grânulos de enxofre bacterianos descritos até hoje são constituídos apenas por proteína. STROHL, GEFERS & LARKIN (1981) realizaram as medidas em amostras processadas para citoquímicas que tinham objetivos diferentes: Ryter-Kellerberger e vermelho de rutênio são utilizados com o objetivo de revelar carboidratos ácidos, de forma que a probabilidade de detecção de lipídios compondo os envelopes poderia ser menor.

Os outros grânulos que parecem também estar localizados periplasmicamente, por estarem dentro de invaginações da membrana citoplasmática, não se assemelham aos grânulos de enxofre, nem aos de polifosfato. Estes grânulos com estruturas radiais também foram observados em *Thioploca*, gênero próximo a *Beggiatoa*, mas da mesma forma, não houve caracterização nem identificação do seu conteúdo (MAIER & GALLARDO, 1984).

Os grandes vacúolos observados na microscopia confocal dos tricomas largos provavelmente contêm nitrato. Os vacúolos de nitrato foram descritos em bactérias filamentosas marinhas (MUßMAN *et al.*, 2003) como “ausência de

citoplasma e a presença de grandes vacúolos que provavelmente contêm líquido... é uma propriedade comum a todos os filamentos longos de *Beggiatoa*” (NELSON, WIRSEN & JANNASH, 1989). Todos os grandes vacúolos intracitoplasmáticos que ocorrem em filamentos longos de bactérias sulfurosas foram descritos como vacúolos de nitrato, exceto aqueles descritos para filamentos não-móveis vacuolados (VAF – vacuolated attached filaments) isolados de fendas hidrotermais (KALANETRA, HUSTON & NELSON, 2004), que não estão envolvidos com o acúmulo de nitrato. Além disso, VAF é a única bactéria filamentosa presente no ramo de bactérias vacuoladas marinhas da árvore filogenética baseada no 16S rRNA das bactérias filamentosas oxidantes de enxofre, que não pertence aos gêneros *Thioploca* e *Beggiatoa* (TESKE & NELSON, 2006). NELSON, WIRSEN & JANNASH (1989), quando estudaram os cortes ultrafinos de um filamento longo, observaram a presença de um grande vacúolo, que compreendia quase todo o espaço intracelular, com o citoplasma “espremido” em uma fina camada entre os limites do vacúolo e a membrana citoplasmática. Apesar de terem atestado a existência do vacúolo, não foi possível observar a presença de um envoltório que separasse o líquido do vacúolo do conteúdo citoplasmático. Nossas observações em microscopia confocal a *laser* realizadas durante o processo de divisão celular mostram que os grandes vacúolos possuem um envoltório que separam o seu conteúdo do citoplasma, apesar de não ter sido possível observá-lo na microscopia eletrônica.

Em 2008, KAMP, RØY & SCHULZ-VOGT estudaram o crescimento, a quebra e o movimento de filamentos de *Beggiatoa* vacuolada e viram que as condições ótimas de crescimento levam à morte celular, ou seja, havia a formação de mais necrídias, para a quebra dos filamentos e consequente aumento da população. Assim, conforme o tempo da cultura havia mais filamentos em número, mas estes eram cada vez menores em comprimento, sugerindo uma resposta sinalizada às condições ambientais para a multiplicação bacteriana, que pode ser composta por comunicação intercelular. Através da microscopia confocal a *laser* utilizada neste estudo, foi visto que os septos que dividem as células individuais, formados pela membrana citoplasmática em conjunto com a primeira camada do envelope celular, em ambos os tipos de filamentos, parecem ter algumas interrupções ao longo da

espessura do tricoma. Talvez estas interrupções estejam envolvidas com este processo de comunicação intercelular responsável, entre outras coisas, pela quebra do tricoma durante o crescimento da população de *Beggiatoa*.

As micrografias obtidas por MET de tricomas estreitos processados por substituição a frio mostraram inclusões eletrondensas que provavelmente são corpos de inclusão ricos em polifosfato, como aqueles detectados na microanálise de raios-X. O aspecto do grânulo é muito parecido com a micrografia obtida pela visualização da célula inteira, sem contrastação. Além disso, a técnica de contrastação para visualização de corpos de polifosfato foi considerada não-específica (KRIEG & HYLERMON, 1976) e o processamento para substituição a frio foi realizado sem pós-fixação com tetróxido de ósmio. Sendo assim, é menor a possibilidade de ser esta uma inclusão lipídica, já que os íons uranila formam complexos com afinidade por grupos aniônicos, especialmente fosforila e carboxila (HAYAT, 2000) e os corpos ricos em polifosfato são esféricos e realmente similares aos corpos lipídicos (LEE, 1999). Além disso, nas amostras processadas pelo método ósmio-imidazol não foi possível detectar a presença de grânulos fortemente eletrondensos, característicos na detecção de inclusões compostas por lipídios insaturados (HAYAT, 2000; SILVA *et al.*, 2008), e que geralmente aparecem como estruturas eletrolucentes em microscopia eletrônica de transmissão (WÄLTERMANN & STEINBÜCHEL, 2006). As únicas inclusões lipídicas evidenciadas em bactérias do gênero *Beggiatoa* foram do tipo PHB as quais parecem ser características apenas de filamentos de água doce (TESKE & NELSON, 2006).

Outras inclusões também foram observadas neste trabalho. Pela localização, podem ser grânulos contendo o polímero que é exsudado durante o deslizamento. Em 1997 foi observada a presença de grânulos eletrondensos na periferia de filamentos de *Phormidium uncinatum*, uma cianobactéria filamentosa deslizante (HOYCZYCK & BAUMEISTER, 1997). Os grânulos observados provavelmente seriam compostos por carboidratos, pois foram evidenciados através da utilização de um reagente próprio. Através da citoquímica com vermelho de rutênio, para detecção de carboidratos ácidos, também observamos a presença destes grânulos periféricos, sugerindo que realmente ocorre uma estocagem deste material, antes da liberação durante o

movimento. Assim, observamos mais uma diferença entre estes filamentos e a espécie *B. alba*, uma vez que o polissacarídeo liberado por esta espécie é composto por carboidratos neutros (manose e glicose). Apesar de termos realizado uma citoquímica para localizar sítios de afinidade de cálcio, o processamento levou apenas à boa preservação do material, permitindo a observação de tais estruturas.

## 5.2 Análise filogenética

De acordo com a literatura, as bactérias pertencentes ao gênero *Beggiatoa* são normalmente classificadas em dois tipos. Quando os tricomas apresentam entre 2 e 5  $\mu\text{m}$ , estes são considerados estreitos; por outro lado, tricomas com mais de 9  $\mu\text{m}$ , são considerados largos e sempre apresentam vacúolo intracitoplasmático (AHAMD, KALANETRA & NELSON, 2006).

Ao longo do tempo, tem sido observado que estes filamentos diferem não apenas fenotípica, mas também filogeneticamente. Bactérias “gigantes”, com diâmetros maiores, estão filogeneticamente relacionadas aos gêneros *Beggiatoa*, *Thioploca* e *Thiomargarita* (AHMAD, BARRY & NELSON, 1999; KOJIMA & FUKUI, 2003; MUMMANN et al., 2003; HINCK et al., 2007). Em 2006 foi definido, através da análise filogenética do 16S rRNA, um ramo formado pelas bactérias sulfurosas largas vacuoladas, e outro pelas *Beggiatoa* de água doce; estando os dois ramos dentro de um grupo maior (ramo *Beggiatoa/Thioploca*) (AHMAD, KALANETRA & NELSON, 2006). Entretanto, os filamentos vacuolados estudados por HINCK et al. (2007) mostraram-se filogeneticamente relacionados às estirpes marinhas MS-81-6 e MS-81-1c, estreitas e não-vacuoladas. O argumento utilizado pelos autores foi que, apesar de diferirem em dois aspectos, diâmetro e vacuolação, todas parecem ser tolerantes a salinidades acima da marinha. Desta forma, o fator evolutivo determinante teria sido o ambiente de isolamento (salino/hipersalino).

No presente estudo, os tricomas não-vacuolados, de diâmetros semelhantes, foram agrupados juntamente com MS-81-6, mas ao contrário do observado anteriormente, os filamentos do Lago Chiprana (HINCK et al., 2007) foram agrupados juntamente com os filamentos vacuolados, em um ramo distinto, sempre com valores robustos de ‘bootstrap’, acima de 80%. Assim, apesar de a vacuolação e a capacidade de estocar nitrato não estarem

relacionadas apenas a filamentos de grandes diâmetros, todos os que possuem estas características parecem fazer parte de um mesmo ramo nas árvores filogenéticas baseadas na análise o gene *rrs*. Então, não só o ambiente, água doce, marinho ou hipersalino, mas também a habilidade de estocar nitrato e atingir (ou não) maiores diâmetros é determinante na determinação dos grupos filogenéticos.

A única análise em que as sequências do Lago Chiprana ficaram agrupadas com os tricomas marinhos não-vacuolados, foi aquela realizada apenas com sequências de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre, mas ainda assim com um valor de 'bootstrap' abaixo de 50%. Nesta análise foi utilizado um modelo de distância distinto dos outros casos, com um cálculo da distância entre as sequências diferente, o que acarretou em um agrupamento distinto do observado anteriormente. Ainda assim, as sequências provenientes de Araruama permaneceram no mesmo ramo, com 100% de 'bootstrap'.

As duas sequências de filamentos provenientes da Lagoa de Araruama apresentaram 97% de similaridade, entre si. O fato de agruparem separadamente na árvore filogenética se deve ao fato de MS-81-6 ser mais próxima à Araruama I, do que esta à Araruama II, tendo 97% de similaridade com Araruama II e 96% de similaridade com Araruama I. Desta forma, independente do valor de distância utilizado entre sequências do gene *rrs*, Araruama I e MS-81-6 ficam juntas e ambas separadas de Araruama II. Segundo estudos prévios, este valor de similaridade poderia indicar que estas sequências são provenientes de filamentos de uma mesma espécie, uma vez que bactérias com pelo menos 70% de similaridade no DNA total apresentam, em grande parte, mais de 96% de similaridade entre os genes *rrs* (STACKEBRANDT & GÖBEL, 1994; LUDWIG et al., 1998).

Entretanto, sabe-se que apesar de amplamente utilizado, principalmente pela quantidade de sequências depositadas em bancos de dados, o gene que codifica o 16S rRNA tem pouco poder de resolução em nível de espécie, quando analisados determinados grupos bacterianos. Existem espécies com sequências do gene *rrs* idênticas, ou quase idênticas, demonstrando uma micro-heterogeneidade dos genes que codificam o 16S rRNA dentro da mesma espécie; ou ainda casos de bactérias com mais de uma cópia deste gene e que



apresentam uma divergência relativamente alta (FROTHINGHAM, HILLS & WILSON, 1994; NÜBEL et al., 1996; NIEMANN et al., 2000).

As diferenças pontuais que existem entre as sequências de Araruama podem ser devido a erros de incorporação de bases, realizados pela enzima DNA polimerase durante a PCR ou ao longo da evolução e diferenciação em duas estirpes, resultando nesta distância filogenética. Em 2001 foi realizado um estudo para avaliar a geração de quimeras, mutações e heteroduplex por PCR em análises baseadas na clonagem do gene *rrs* (QIU *et al.*, 2001). Apesar de ser possível a ocorrência de três tipos de artefatos gerados pela PCR em estudos baseados na clonagem deste gene, os autores concluíram que mutações pontuais têm muito pouco ou nenhum efeito sobre a topologia geral de uma árvore filogenética, quando esta é formada pela análise de sequências completas ou quase completas.

A utilização dos genes que codificam o rRNA em análises filogenéticas se deve ao fato de estas moléculas serem amplamente distribuídas e conservadas, devido ao seu papel vital durante a síntese protéica no ribossoma. Estas moléculas são grandes e capazes de carrear um considerável número de informações genéticas, por isso têm sido extensivamente utilizadas como base molecular para reconstruções filogenéticas nos últimos 30 anos. Além disso, duas outras características destes genes são essenciais para sua utilização como marcador molecular: a baixa ocorrência de transferência lateral e a taxa de evolução e dissimilaridades nas sequências de dois, ou mais organismos, que refletem a variabilidade do genoma total (STACKEBRANDT & GÖBEL, 1994; ROSSELÓ-MORA & AMANN, 2001). Uma vez que sua estrutura secundária é extremamente importante para o desempenho funcional da molécula, esta é suficientemente conservada para manter a estrutura, mas também variável dentro de um determinado grupo, permitindo mutações consideráveis a ponto de separar bactérias de diferentes espécies e que não interfiram na estrutura secundária.

Assim, a análise filogenética baseada no gene *rrs* é, em geral, um excelente método para a identificação inicial de bactérias novas ou pobremente classificadas; sendo então, recomendada a inclusão da sequência do gene

ribossomal em descrições de novas espécies ou para uma afiliação filogenética inicial (ROSSELÓ-MORA & AMANN, 2001).

### **5.3 Avaliação da densidade populacional das bactérias filamentosas do gênero *Beggiatoa* na Lagoa de Araruama**

O fato de ter sido encontrada uma maior biomassa de *Beggiatoa* sp. no mês de setembro/2008 pode ser devido ao índice pluviométrico do mês de janeiro/2009 ter sido bem maior. Nas regiões de coleta, os meses de verão são bastante quentes e chuvosos, já o inverno e primavera costumam ser mais secos. Esta característica é o que explica também a queda da quantidade de filamentos na coluna d'água, na região da CNA. Em Cabo Frio, no ponto de coleta da Lagoa de Araruama próxima à região da CNA, a coluna d'água varia entre 20-30 cm, em média. Além disso, o espelho d'água também varia bastante de acordo com a maré, principalmente em épocas de pouca chuva. Desta forma, a pouca quantidade de chuva pode ter influenciado na maior concentração dos filamentos na coluna d'água, no mês de setembro. Enquanto em janeiro, o deslocamento dos filamentos para uma região mais profunda pode ter ocorrido pela maior turbulência causada por ventos e tempestades, aumentando a aeração e, conseqüentemente, a concentração de oxigênio causando mudanças no perfil deste gradiente. Apesar de o decaimento observado no primeiro centímetro permanecer, no segundo centímetro a biomassa de *Beggiatoa* foi superior à da coluna d'água. Já em Praia Seca este evento não foi observado, talvez porque a quantidade de chuva provavelmente não influencia na quantidade de indivíduos da população de *Beggiatoa* nas regiões analisadas, uma vez que a coluna d'água, neste local, é por volta de 70-90 cm. Como as coletas foram realizadas no mesmo horário, aproximadamente, não é possível inferir relações com o ciclo diurno/noturno, no presente estudo.

HINCK *et al.* (2007) observaram que, independente do período, os filamentos permaneceram na mesma região do tapete, entre 4 e 12 mm de profundidade, aproximadamente. Estes dados corroboram a teoria de que filamentos vacuolados permanecem em um mesmo micro-nicho independente da concentração de oxigênio, uma vez que, nestas condições, são capazes de realizar a oxidação do sulfeto utilizando o nitrato como acceptor de elétrons

“alternativo”. Como foi observado pelos autores, durante o período diurno os tricomas evitam a zona sulfídica, enquanto no período noturno, a zona sulfídica “encontra” as bactérias, já que a taxa de oxigênio reduz e a borda da zona sulfídica sobe, no gradiente. Como os filamentos vacuolados permaneceram no mesmo micro-nicho, devido à capacidade de oxidação do sulfeto em anaerobiose, a conclusão foi de que haveria a formação de duas populações durante o período noturno, uma na zona sulfídica, e outra na zona óxica. Neste caso, na verdade não houve deslocamento da população, mas sim dos gradientes.

DILLON *et al.* (2009) analisaram a variabilidade espaço-temporal da comunidade bacteriana de um ambiente hipersalino no México (Exportadora de Sal Guerrero Negro) e viram que, durante o dia, as camadas do tapete perto da superfície eram compostas por mais de 25% de *Beggiatoa* e, à noite, as sequências referentes às bactérias deste gênero não foram detectadas. Os dados obtidos sugerem que houve migração dos filamentos para camadas mais profundas, ou para a coluna d'água.

Em 2007, quando PREISLER *et al.* estudaram a oxidação química e a oxidação biológica do sulfeto, em ambiente marinho, viram que apenas uma pequena fração do sulfeto oxidado era relacionado à atividade de *Beggiatoa*, sendo a maior parte realizada quimicamente e que, na verdade, estas bactérias evitariam a zona sulfídica. Enquanto a maior parte dos tricomas estaria nos primeiros dois centímetros, a zona sulfídica medida *in situ* começaria a ser detectável a partir do segundo centímetro e atingiria o máximo de concentração em 25-30 cm de profundidade, ou seja, distante dos microrganismos. Desta forma, o sulfeto presente na região sub-óxica onde se encontravam os tricomas seria proveniente da redução de sulfato local em conjunto com o sulfeto difundido a partir da zona sulfídica, mais profunda. O mesmo pode ter acontecido durante o período noturno no estudo de HINCK *et al.* (2007) já que em comunicação pessoal (PREISLER *et al.*, 2007) HINCK afirmou que as *Beggiatoa* vacuoladas são repelidas pelo sulfeto, em tubos de gradientes de sulfeto.

A diferença principal entre os dois estudos é que o primeiro (HINCK *et al.*, 2007) foi realizado em microcosmos, enquanto os dados obtidos por PREISLER *et al.* (2007) foram obtidos de medidas realizadas *in situ*. No

segundo caso, apesar de as medidas *in situ* terem o objetivo de verificar o que acontece no próprio ambiente, vários fatores externos influenciam na hora das medidas, como a turbulência nas camadas superiores do sedimento devido à manipulação e ao próprio distúrbio provocado pelo navio, utilizado na coleta. A questão principal a ser respondida é se a taxa negativa ao sulfeto detectada por PREISLER *et al.* (2007) *in situ*, também seria observada em período noturno. As amostragens estudadas pelos dois grupos também foram bastante diferentes, uma vez que HINCK *et al.* (2007) penetraram apenas alguns milímetros do tapete em microcosmo, enquanto PREISLER *et al.* (2007) analisaram mais de 30 cm de profundidade, *in situ*.

A localização dos filamentos de *Beggiatoa* e, conseqüentemente, sua migração, parecem não estar relacionadas apenas aos gradientes sulfeto e oxigênio. Ao contrário do que acontece com relação ao sulfeto, a produção de amônio (via redução dissimilatória de nitrato a amônio) coincidiu perfeitamente com a distribuição de *Beggiatoa* sp., sendo detectado na profundidade máxima de 2 cm (PREISLER *et al.*, 2007). Como o nitrato da água não difunde até esta profundidade, os filamentos de *Beggiatoa* provavelmente foram responsáveis pela produção do amônio, carregando-o intracelularmente para o sedimento. A hipótese sugerida pelo grupo foi a de que um gradiente inclinado de sulfeto seria o ideal para filamentos vacuolados de *Beggiatoa* sp., de forma que uma locomoção randômica em uma zona estreita entre a superfície e o sulfeto levaria os filamentos a alcançarem a superfície com frequência suficiente para preencher os vacúolos com nitrato, novamente. Conseqüentemente, a taxa negativa ao sulfeto levaria estas bactérias a persistirem e crescerem em ambiente anóxico e o mais próximo possível da superfície.

KAMP, STIEF & SCHULZ-VOGT (2006), estudando a oxidação anaeróbica do sulfeto com utilização de nitrato, observaram que a estirpe “estreita” de água doce foi capaz de oxidar mais sulfeto na presença de nitrato. Além disso, a adição do nitrato causou um forte efeito nos micro-gradientes de oxigênio e sulfeto, na posição e na espessura do tapete. Na presença do nitrato, o tapete ficou posicionado mais profundamente no ágar e muito mais espesso, penetrando alguns milímetros na zona sulfídica. Os autores realizaram os experimentos em culturas de enriquecimento, e não verificaram se havia migração de acordo com o período (diurno/noturno), mas claramente

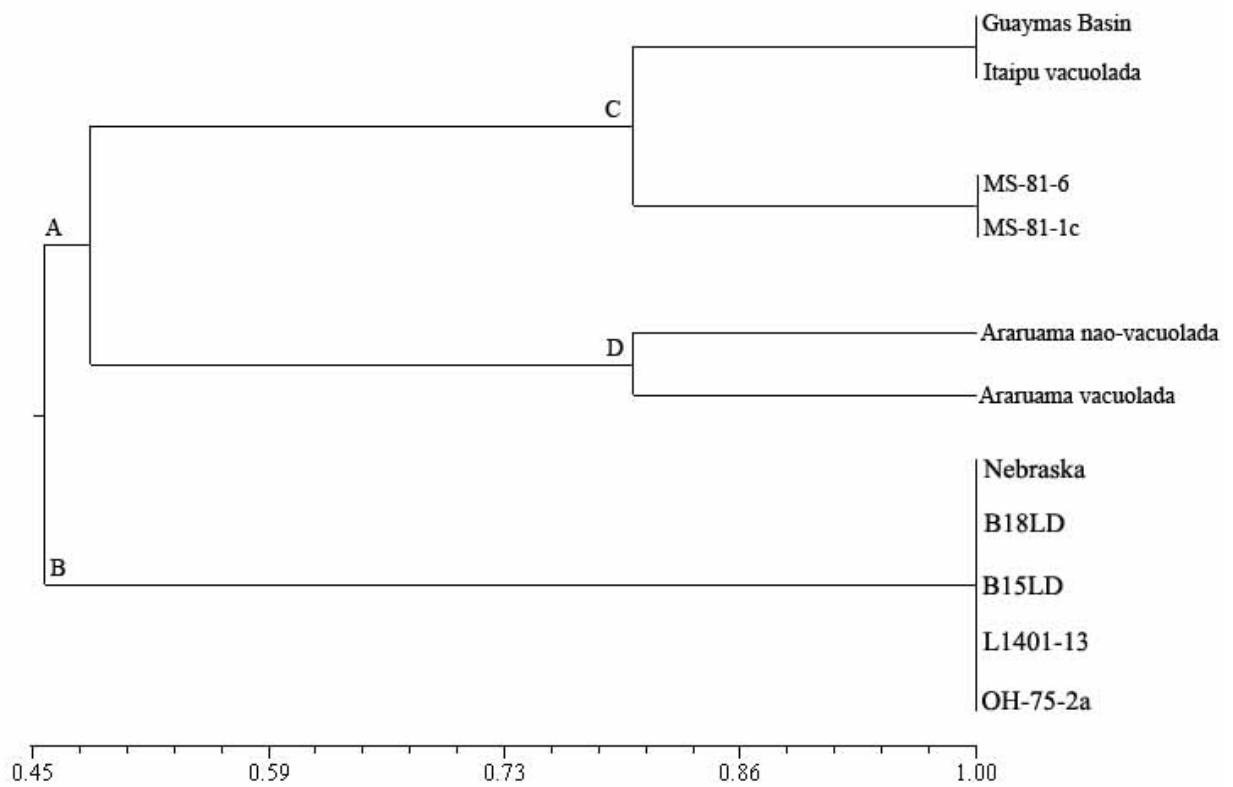
postularam a oxidação anaeróbica do sulfeto com a utilização de nitrato em estirpes estreitas de água doce.

O importante, neste caso, é ressaltar a possibilidade de redução do nitrato por estirpes de *Beggiatoa* não-vacuoladas. Já que foi visto que estes filamentos também são capazes de oxidar sulfeto anaerobicamente, mas ainda não foi esclarecido, nem comparado, se o comportamento migratório difere entre os dois tipos de *Beggiatoa*, vacuolada e não-vacuolada. Logo, a migração dos filamentos vacuolados, bem como dos filamentos não-vacuolados, parece estar estreitamente relacionada aos gradientes de sulfeto, oxigênio e nitrato.

De acordo com o que foi observado por PREISLER *et al.* (2007), os filamentos parecem ocupar uma grande faixa no ambiente estratificado, desde a coluna d'água até o segundo centímetro de sedimento. Observamos em nosso estudo que há deslocamento dos filamentos dentro desta faixa, de forma que seria complicado afirmar que não há deslocamento de acordo com o gradiente. Os filamentos realmente mudam de posição, apesar de não ter sido determinado qual o fator determinante para a causa deste evento. Os estudos realizados até então observaram a posição dos tricomas dentro de um tapete de apenas alguns milímetros de espessura. Neste trabalho, mostramos que há migração também ao longo de muitos milímetros de profundidade.

Os diâmetros dos tricomas, em adição aos diferentes ambientes onde foram encontrados separam estes microrganismos de outros previamente descritos. Tanto quanto sabemos, este é o primeiro registro de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre com características morfológicas de *Beggiatoa* em um ambiente costeiro hipersalino raso (menos de 1 m). HINCK *et al.* (2007) encontraram *Beggiatoa* vacuolada hipersalina entre 6 e 8  $\mu\text{m}$ , coletados a uma profundidade de 5,6 m. GALLARDO & ESPINOZA (2007) recentemente encontraram diferentes macro-bactérias, desde < 1  $\mu\text{m}$  até quase 10  $\mu\text{m}$ , em pouco mais de 20 m de profundidade, a oeste do Pacífico Sul, a 28 km da costa. MCHATTON *et al.* (1996) descreveram filamentos largos vacuolados do gênero *Beggiatoa* de 65 a 86  $\mu\text{m}$ , a 900 m de profundidade no Clam Field Seep, na costa de Monterey, California. NELSON, WIRSEN & JANNASH (1989) encontraram *Beggiatoa* largas, entre 90 e 160  $\mu\text{m}$ , em fendas hidrotermais no fundo do mar.

As características morfológicas observadas nas *Beggiatoa* do Rio de Janeiro são similares, mas não idênticas, a outras previamente descritas que tiveram sua ultra-estrutura estudada (MORITA & STAVE, 1963; STROHL, GEFERS & LARKIN, 1981; STROHL, HOWARD & LARKIN, 1982). Um dendrograma foi obtido a partir dos dados obtidos neste trabalho, em conjunto com os dados ultra-estruturais previamente publicados (Figura 28). Como podemos observar, baseado na morfologia descrita até hoje, existem dois grupos de *Beggiatoa* onde foram realizados estudos ultra-estruturais: *Beggiatoa* encontradas em água salgada (grupo A) e *Beggiatoa* isoladas de água doce (grupo B). Os filamentos de *Beggiatoa* das Lagoas de Araruama e Itaipu diferem dos outros, devido ao ambiente onde foram encontrados. Apesar de as vacuoladas de Itaipu terem agrupado com Guaymas Basin (grupo C), na realidade não há estudos aprofundados na ultra-estrutura de filamentos vacuolados, até hoje. NELSON, WIRSEN & JANNASH (1989) observaram cortes ultrafinos de uma *Beggiatoa* vacuolada, mas não exploraram as diferenças existentes entre os dois tipos de filamentos destas bactérias; foi apenas sugerido que a parede celular multicamadas seria similar à descrita para *Thioploca* (MAIER & GALLARDO, 1984) e não foi possível observar a presença de membrana em volta do vacúolo. Os únicos dados concretos obtidos de uma análise ultra-estrutural detalhada descritos até hoje foram realizados em *Beggiatoa* de água doce, as quais compõem o grupo B. As bactérias filamentosas oxidantes de enxofre das Lagoas de Araruama e Itaipu agruparam perto, mas separadamente umas das outras, de acordo com a presença ou ausência dos vacúolos de nitrato e o ambiente onde foram encontradas. As estirpes MS-81-6 e MS-81-1c, que compõem o grupo D, foram inseridas nos dados apenas para representar as estirpes marinhas não-vacuoladas, mas não há estudos ultra-estruturais realizados com as mesmas. Através do dendrograma, é possível visualizar melhor a importância dos dados ultra-estruturais obtidos neste trabalho, que confirmam a existência de diferenças entre a morfologia de *Beggiatoa* estreitas e largas.



**Figura 28:** Dendrograma construído com base nos dados morfológicos previamente publicados e os obtidos neste estudo, onde (A) *Beggiatoa* água salgada, (B) *Beggiatoa* água doce, (C) *Beggiatoa* marinha e (D) *Beggiatoa* hipersalina. É possível perceber que este é o primeiro estudo ultra-estrutural de *Beggiatoa* vacuolada.

## 6 Conclusões

Através dos dados obtidos foi possível concluir que:

1. As populações de filamentos oxidantes de enxofre presentes nas Lagoas de Araruama e Itaipu são diferentes entre si, não tendo sido observada a presença de filamentos não-vacuolados em Itaipu;
2. A velocidade média de deslizamento foi determinada e observamos que há diferenças entre as velocidades médias de deslocamento dos filamentos vacuolados e não-vacuolados da Lagoa de Araruama, uma vez que os filamentos vacuolados são mais lentos;
3. Existe um possível motor molecular, formado por fibrilas superficiais longitudinais, em ambos os tipos de filamentos, as quais estão envolvidas no processo de deslizamento juntamente com a extrusão de um polímero;
4. Existem diferenças estruturais que separam os filamentos oxidantes de enxofre vacuolados e não-vacuolados. Estas diferenças não estão presentes apenas na capacidade de estocar nitrato em grandes vacúolos intracitoplasmáticos, mas também, e principalmente, na estrutura do envelope celular;
5. Os métodos citoquímicos permitiram um melhor entendimento da estrutura e do funcionamento celular, fornecendo dados que auxiliaram no processo de caracterização do movimento por deslizamento realizado pelos filamentos oxidantes de enxofre, assim como na análise estrutural;
6. Através da análise filogenética foi possível confirmar que os filamentos oxidantes de enxofre não-vacuolados da Lagoa de Araruama pertencem ao gênero *Beggiatoa*, validando a identificação morfológica;
7. Apesar de não ter sido determinado, neste trabalho, a posição do gradiente sulfeto:oxigênio e se os filamentos possuem taxia negativa com relação ao enxofre, foi possível observar que os filamentos estão presentes tanto na coluna d'água, quanto no sedimento, e migram de acordo com condições externas que, provavelmente, influenciam os fatores abióticos.

As diferenças ultra-estruturais entre as bactérias filamentosas de lagoas costeiras brasileiras e os dados previamente descritos para a bactéria



filamentosa estreita oxidante de enxofre *B. alba* podem ser devido às diferenças de diâmetro, espécie ou ambiente onde foram encontrados (ambiente salino, hipersalino e água doce). Nossos dados baseados nas características morfológicas observadas nas bactérias filamentosas oxidantes de enxofre do Rio de Janeiro sugerem que os tricomas pertencem ao gênero *Beggiatoa* e a análise filogenética do gene *rrs* confirma este fato. Além disso, mostramos pela primeira vez, as diferenças que ocorrem entre a estrutura dos filamentos largos e estreitos, enriquecendo o pacote de inferências sobre a distância evolutiva baseada nas sequências ambientais, com uma análise estrutural mais refinada.

Desta forma, agrupando todos os dados obtidos neste estudo, poderíamos sugerir que os filamentos não-vacuolados encontrados na Lagoa de Araruama provavelmente pertencem a uma espécie distinta de *Beggiatoa* sp., apesar de ser necessário a realização de estudos bioquímicos e fisiológicos para se delinear uma nova espécie.

## 7 Referências bibliográficas:

- ADAMS, D. G.; ASHWORTH, D. & NELMES, B. **Fibrillar array in the cell wall of a gliding filamentous cyanobacterium.** J. Bacteriol., 181, 884-892, 1999.
- AHMAD, A., KALANETRA, K. M. & NELSON, D. C. **Cultivated *Beggiatoa* spp. define phylogenetic root of morphologically diverse, noncultured, vacuolated sulfur bacteria.** Can. J. Microbiol., 52, 591-598, 2006.
- ANDREAE, M. C. & BERNARD, W. R. **The marine chemistry of dimethylsulfide.** Mar. Chem., 14, 267-279, 1984.
- ANGERMÜLLER, S. & FAHIMI, H. D. **Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy.** Histochem. J., 14, 823-835, 1982.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY **Genus *Beggiatoa*, nonphotosynthetic, nonfruiting gliding bacteria, subgroup 3: sulfur-oxidizing gliding bacteria**, 491-492, (9<sup>a</sup> ed.). Editado por Williams & Wilkings, Baltimore, 1994.
- BERNADET, J. F., SEGERS, P., VANCANNEYT, M., BERTHE, F., KERTERS, K. & VANDAMME, P. **Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978).** Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 128-148, 1996.
- BHAYA, D., BIANCO, N. R., BRYANT, D. & GROSSMAN, A. R. **Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803.** Mol. Microbiol., 37, 941-951, 2000.
- BOS, P. & KUENEN, J. G. **Morphology of sulfur oxidizing bacteria.** In: Microbial corrosion, 18-27. Editado por The Metal Society London, 1983.
- BOZOLLA, J. J. & RUSSEL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists.** Editado por Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1992.
- BURCHARD, R. P. **Trail following by gliding bacteria.** J. Bacteriol., 152, 495-501, 1982.
- CASTENHOLZ, R. W. & WATERBURY, J. B. **Oxygenic phototrophic bacteria.** In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 377-426, (9<sup>a</sup> ed.). Editado por Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G., Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- CLAUSEN, V., JONES, J. G. & STAKEBRANDT, E. **16S ribosomal analysis of *Filibacter limicola* indicates a close relationship to the genus *Bacillus*.** J. Gen. Microbiol., 131, 2659-2663, 1985.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. & LAPPIN-SCOTT, H. M. **Microbial biofilms.** Annu. Rev. Microbiol., 49, 711-745, 1995.
- DILLON, J. G., MILLER, S., BERBOUT, B., HULLAR, M., PINEL, N. & STAHL, D. A. **Spatial and temporal variability in a stratified hypersaline microbial mat community.** FEMS Microbiol. Ecol., 68, 46-58, 2009.
- DUSENBERY, D. B. **Sensory ecology. How organisms acquire and respond to information.** Edited by Freeman W. H. and Company, New York, N.Y. 1992.
- ÉDEN, P. A., SCHMIDT, T. M., BLAKEMORE, R. P. & PACE, N. R. **Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA.** Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 324-325, 1991.
- FAÛRÉ-FREMIET, E. & ROUILLER, C. **Etude au microscope électronique d'une bactérie sulfureuse, *Thiovulum majus* Hinze.** Exp. Cell Res., 14, 29-46, 1958.

- FAUST, L. & WOLFE, R. S. **Enrichment and cultivation of *Beggiatoa alba***. J. Bacteriol., 81, 99-106, 1961.
- FENCHEL, T. & THAR, R. “**Candidatus *Ovobacter propellens***”: a large conspicuous prokaryote with an unusual motility behaviour. FEMS Microbiol. Ecol. 48, 231–238, 2004.
- FORBES, M. S., PLANTHOLT, B. A. & SPERALAKIS, N. **Cytochemical staining procedures selective for sarcotubular systems of muscle: modifications and applications**. J. Ultrastruct. Res., 60, 306-327, 1977.
- FROTHINGHAM, R., HILLS, H. G. & WILSON, K. H. **Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex**. J. Clin. Microbiol., 32, 1639–1643, 1994.
- GALLARDO, V. A. & ESPINOZA, C. **New communities of large filamentous sulfur bacteria in the eastern South Pacific**. Int. Microbiol., 10, 97-102, 2007.
- GRABOVICH, M. Y., PATRITSKAYA, V. Y., MUNTYAN, M. S. & DUBININA, G. A. **Lithoautotrophic growth of the freshwater strains *Beggiatoa* D-402 and energy conservation in a homogeneous culture under microoxic conditions**. FEMS Microbiol. Lett., 204, 341-345, 2001.
- GÜDE, H., STROHL, W. R. & LARKIN, J. M. **Mixotrophic and heterotrophic growth of *Beggiatoa alba* in continuous culture**. Arch. Microbiol., 129, 357-360, 1981.
- HAGEN, K. D. & NELSON, D. C. **Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* spp.: enzymology and physiology of marine and freshwater strains in homogeneous and gradient cultures**. Appl. Environ. Microbiol., 63, 3957-3964, 1997.
- HARSHEY, R. M. **Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria**. Mol. Microbiol., 13, 389-394, 1994.
- HARTZELL, P. L. & YOUNDERIAN, P. **Genetics of gliding motility and development in *Myxococcus xanthus***. Arch. Microbiol., 164, 309-323, 1995.
- HAYAT, M. A. **Osmium tetroxide**. In: Principles and techniques of electron microscopy: biological applications, 45-60, (4<sup>th</sup> Ed.). Edited by Hayat, M. A., Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 2000.
- HEAD, I. M., GRAY, N. D., BABENZIEN, H. & GLÖCKNER, F. O. **Uncultured giant sulfur bacteria of the genus *Achromatium***. FEMS Microbiol. Ecol., 33, 171-180, 2000.
- HENRICHSEN, J. **Twitching motility**. Annu. Rev. Microbiol., 37, 81-93, 1983.
- HILLEBRAND, H., DÜRSELEN, C. D., KIRSCHTEL, D., POLLINGHER, U. & ZOHARY, T. **Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae**. J. Phycol., 2, 35, 403-424, 1999.
- HINCK, S., NEU, T. R., LAVIK, G., MUSSMANN, M., DE BEER, D. & JONKERS, H. M. **Physiological adaptation of a nitrate-storing *Beggiatoa* sp. to diel cycling in a phototrophic hypersaline mat**. Appl. Environ. Microbiol., 73, 7013-7022, 2007.
- HOICZYCK, E. & BAUMEISTER, W. **Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria**. J. Bacteriol., 177, 2387-2395, 1995.
- HOICZYCK, E. & BAUMEISTER, W. **Oscillin, an extracellular, Ca<sup>2+</sup>-binding glycoprotein essential for gliding motility of cyanobacteria**. Mol. Microbiol., 26, 699-708, 1997.

- HOICZYCK, E. & BAUMEISTER, W. **The junctional pore complex, a prokariotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria.** *Curr. Biol.*, 8, 1161-1168, 1998.
- HOICZYCK, E. **Structural and biochemical analysis of the sheath of *Phormidium uncinatum*.** *J. Bacteriol.*, 180, 3923-3932, 2000.
- HUMPHREY, B. A., DICKSON, M. R. & MARSHALL, K. C. **Physiochemical and *in situ* observations on the adhesion of gliding bacteria to surfaces.** *Arch. Microbiol.*, 120, 231-238, 1979.
- JANNASCH, H. W. **Chemosynthetically sustained ecosystems in the deep sea.** In: *Autotrophic bacteria*, 45-65. Editado por Schlegel, H.G., Bowien, B., Science Tech Publishers Madison, WI, 1988.
- JANNASCH, H. W. **The chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep sea hydrothermal vents.** *Proceedings of the Royal Society, London*, Vol. B225, 277-297, 1985.
- JØRGENSEN, B. B. & REVSBECH, N. P. **Colorless sulfur bacteria *Beggiatoa* spp. and *Thiovulum* spp., in O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S microgradients.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1261-1270, 1983.
- JØRGENSEN, B. B., KUENEN, J. G. & COHEN, Y. **Microbial transformations of sulfur compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinal).** *Limnol. and Ocean.*, 24, 799-822, 1979.
- KALANETRA, K. M., HUSTON, S. L. & NELSON, D. C. **Novel, attached, sulfur-oxidizing bacteria at shallow hydrothermal vents posses vacuoles not involved in respiratory nitrate accumulation.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7487-7496, 2004.
- KAMP, A., RØY, H. & SCHULZ-VOGT, H. N. **Video-supported analysis of *Beggiatoa* filament growth, breakage and movement.** *Microbiol. Ecol.*, 56, 484-491, 2008.
- KAMP, A., STIEF, P. & SCHULZ-VOGT, H. N. **Anaerobic sulfid oxidation with nitrate by a freshwater *Beggiatoa* enrichment culture.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4755-4760, 2006.
- KIRCHHOFF, H. **Motility.** In: "Mycoplasmas – Molecular Biology and Pathogenesis", 289-306. Editado por Maniloff, J., McElhaney, R.N., Finch, L.R., Baseman, J.B., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1992.
- KJERFVE, B., SCHETTINI, C. A. F., KNOPPERS, B., LESSA, G. & FERREIRA, H. O. **Hidrology and salt balance in a large, hypersaline coastal lagoon: Lagoa de Araruama, Brasil.** *Est. Coast. Shelf Sci.*, 42, 701-725, 1996.
- KOJIMA, H. & FUKUI, M. **Phylogenetic analysis of *Beggiatoa* spp. from organic rich sediment of Tokio Bay, Japan.** *Water Res.*, 37, 3216-3223, 2003.
- KOJIMA, H., TESKE, A. & FUKUI, M. **Morphological and phylogenetic characterizations of freshwater *Thioploca* species from Lake Biwa, Japan, and Lake Constance, Germany.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 390-398, 2003.
- KOWALLIK, U. & PRINGSHEIM, E. G. **The oxidation of hydrogen sulfide by *Beggiatoa*.** *Am. J. Bot.*, 53, 801-806, 1966.
- KRIEG, N. R. & HYLEMON, P. B. **The taxonomy of the chemoheterotrophic spierilla.** *Ann. Rev. Microbiol.*, 30, 303-325, 1976.
- KUHLER, P. C., FERREIRA, A. S., SILVA, J. A. & SILVA, A. T. **A análise da diminuição do espelho d'água das Lagoas de Itaipu e Piratininga com o subsídio do sensoriamento remoto.** *Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, INPE, p. 3651-3653, 2005.

LARKIN, J. M. & STROHL, W. R. **Beggiatoa, Thiothrix, and Thioploca**. Annu. Rev. Microbiol., 37, 341-367, 1983.

LARKIN, J. M. **Nonphotosynthetic, nonfruiting gliding bacteria**. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 483-515, (9<sup>a</sup> Ed.). Editado por Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G., Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

LEE, R. E. **Cyanobacteria**. In: Phycology, 67-91, (3<sup>a</sup> Ed.). Editado por Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 1999.

LUDWIG, W., STRUNK, O., KLUGBAUER, S., KLUGBAUER, N., WEIZENEGGER, M., NEUMAIER, J., BACHLEITNER, M. & SCHLEIFER, K.-H. **Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis**. Electrophoresis, 19, 554-568, 1998.

LUFT, J. H. **Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues**. Anat. Rec., 171, 369-376, 1971.

MACALADY, J. L., SHARMISHTHA, D., SCHAPERDOTH, I., JONES, D. S., DRUSCHEL, G. K. & EASTMAN, D. **Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters**. ISME J., 2, 590-601, 2008.

MACRAE, T. H., DOBSON, W. J. & MCCURDY, H. D. **Fimbriation in gliding bacteria**. Can. J. Microbiol., 23, 1096-1108, 1977.

MAIER, S. & GALLARDO, V. A. **Thioploca araucae sp. nov. and Thioploca chileae sp. nov.** Int. J. Syst. Bacteriol., 34, 414-418, 1984.

MARSHALL, K.C. **Planktonic versus sessil life of prokaryotes**. In: The prokaryotes, Vol. 2., 3-15, (3<sup>a</sup> Ed.). Editado por Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Springer-Verlag, 2006.

MCBRIDE, M. J. **Bacterial gliding motility: mechanisms and mysteries**. ASM News, 66, 203-210, 2000.

MCBRIDE, M. J. **Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces**. Annu. Rev. Microbiol., 55, 49-75, 2001.

MCCURDY, H. D. **Order Myxococcales**. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 2139-2170. Editado por Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G. Williams & Wilkins, Baltimore, 1989.

MCHATTON, S. C., BARRY, J. P., JANNASCH, H. W. & NELSON, D. C. **High nitrate concentrations in vacuolate, autotrophic marine Beggiatoa spp.** Appl. Environ. Microbiol., 5, 523-533, 1996.

MEZZINO, M. J., STROHL, W. R., & LARKIN, J. M. **Characterization of Beggiatoa alba**. Arch. Microbiol., 137, 139-144, 1984.

MØLLER, M. M., NIELSEN, L. P. & JØRGENSEN, B. B. **Oxygen responses and mat formation by Beggiatoa spp.** Appl. Environ. Microbiol., 50, 373-382, 1985.

MORITA, R. Y. & STAVE, P. W. **Electron micrograph of an ultrathin section of Beggiatoa**. J. Bacteriol., 85, 940-942, 1963.

MUßMANN, M., SCHULZ, H.N., STROTMANN, B., KJŹR, T., NIELSEN, L.P., ROSSELÓ-MORA, R.A., AMANN, R.I. & JØRGENSEN, B.B. **Phylogeny and distribution of nitrate-storing Beggiatoa spp. in coastal marine sediments**. Environ. Microbiol., 5, 523-533, 2003.

- NELSON, D. C. & CASTENHOLZ, R. W. **The use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* sp.** J Bacteriol 147:140-154, 1981.
- NELSON, D. C. & JANNASCH, H. W. **Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures.** Arch. Microbiol., 136, 262-269, 1983.
- NELSON, D. C., WIRSEN, C. O. & H.W.. **Characterization of a large, autotrophic *Beggiatoa* spp. abundant at hydrothermal vents of the Guaymas Basin.** Appl. Environ. Microbiol., 55, 2909-2917, 1989.
- NIEMANN, S., HARMSSEN, D., SCH-GERDES, S. R. & RICHTER, E. **Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex Isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis.** J. Clin. Microbiol., 38, 3231-3234, 2000.
- NÜBEL, U., ENGELEN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R. I., LUDWIG, W. & BACKHAUS, H. **Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis.** J. Bacteriol., 178, 5636-5643, 1996.
- OSCHMAN, J. L. & WALL, B. J. **Calcium binding to intestinal membranes.** J. Cell Biol., 55, 58-67, 1972.
- OTTE, J. S., KUENEN, G., NIELSEN, L. P., PAERL, H. W., ZOPFI, J., SCHULZ, H. N., TESKE, A., STROTMANN, B., GALLARDO, V. A. & JØRGENSEN, B. B. **Nitrogen, carbon, and sulfur metabolism in natural *Thioploca* samples.** Appl. Environ. Microbiol., 65, 3148-3157, 1999.
- PASTERIS, J. D., FREEMAN, J. J., GOFFREDI, S. K. & BUCK, K. R. **Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria.** Chem. Geo., 180, 3-18, 2001.
- PATE, J. L. & DE JONG, D. M. **Use of nonmotile mutants to identify a set of membrane proteins related to gliding motility in *Cytophaga johnsonae*.** J. Bacteriol., 172, 3117-3124, 1990.
- PFENING, N. & TRUPER, H. **Anoxygenic phototrophic bacteria.** In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 1635-1709. Edited by Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G. Williams & Wilkins, Baltimore, 1989.
- PREISLER, A., DE BEER, D., LICHTSCHLAG, A., LAVIK, G., BOETIUS, A. & JØRGENSEN, B. B. **Biological and chemical sulfide oxidation in a *Beggiatoa* inhabited marine sediment.** ISME J., 1, 341-353, 2007.
- PRINGSHEIM, E. G. **Heterotrophism and species concepts in *Beggiatoa*.** Am. J. Bot., 51, 898-913, 1964.
- QIU, X., WU, L. HUANG, H., MCDONEL, P. E., PALUMBO, A. V., TIEDJE, J. M. & ZHOU, J. **Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning.** Appl. Environ. Microbiol., 67, 880-887, 2001.
- READ, N., CONNELL, S. & ADAMS, D. G. **Nanoscale visualization of a fibrillar array in the cell wall of filamentous cyanobacteria and its implications for gliding motility.** J. Bacteriol., 20, 7361-7366, 2007.
- ROBERTSON, L. A. & KUENEN, J. G. **Anaerobic and aerobic denitrification by sulphide oxidizing bacteria from waste water.** In: Anaerobic waste water treatment, p. 3-12. Editado por van ben Brink, W.J. TNO Corp. Comm. Dept. Netherlands, 1983.
- ROBERTSON, L. A. & KUENEN, J. G. **The colorless sulfur bacteria.** In: The prokaryotes, Vol. 2, 985-1011, (3<sup>a</sup> Ed.). Editado por Dworkin, M., Falcow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stakebrandt, E., Springer, 2006.

- ROSSELLÓ-MORA, R. & AMANN, R. **The species concept for prokaryotes.** FEMS Microbiol. Rev., 25, 39-67, 2001.
- SAITOU, N. & NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Mol. Biol. Evol., 4, 406-425, 1987.
- SAYAMA, M., RISGAARD-PETERSEN, N., NIELSEN, L. P., FOSSING, H. & CHRISTENSEN, P. B. **Impact of bacterial NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport on sediment biogeochemistry.** Appl. Environ. Microbiol., 71, 7575-7577, 2005.
- SCHMIDT, H. L., ARIELI, B., COHEN, Y., PADAN, E. & STROHL, W. R. **Sulfur metabolism in *Beggiatoa alba*.** J. Bacteriol., 169, 5466-5472, 1987.
- SCHULZ, H. N., JØRGENSEN, B. B., FOSSING, H. A. & RAMSING, N. B. **Population study of the filamentous sulfur bacteria *Thioploca* spp. of the Bay of Conception, Chile.** Mar. Ecol. Prog. Ser., 200, 117-126, 2000.
- SCHULZ-VOGT, H. N. **Vacuoles.** In: Inclusions in prokaryotes, 295-298, Editado por Shively, J.M., Springer-Verlag, Berlim, Alemanha, 2006.
- SCOTTEN, H. L. & STOKES, J. L. **Isolation and properties of *Beggiatoa*.** Arch. Microbiol., 42, 353-368, 1962.
- SEGERER, A. & STETTER, K. O. **The genus *Acidianus*.** In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 2251-2253, Vol. 3. Editado por Staley, J., Williams and Wilkins, Baltimore, 1989.
- SILVA, K. T., ABREU, F., KEIM, C. N., FARINA, M. & LINS, U. **Ultrastructure and cytochemistry of lipid granules in the many-celled magnetotactic prokaryote, '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*'.** Micron, 39, 1387-1392, 2008.
- SOARES, M. J. **Detecção de lipídios.** In: Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas, p. 61-63, Editado por DE SOUZA, W., 1998.
- STACKEBRANDT, E. & GÖBEL, B. M. **Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.** Int. J. Syst. Bacteriol., 44, 846-849, 1994.
- STROHL, W. R., HOWARD, K. S. & LARKIN, J. M. **Ultrastructure of *Beggiatoa alba* strain B15LD.** J. Gen. Microbiol., 128, 73-84, 1982.
- STROHL, W. R. & LARKIN, J. M. **Cell division and trichome breakage in *Beggiatoa*.** Curr. Microbiol., 1, 151-155, 1978.
- STROHL, W. R. **The genus *Thiospirillopsis*.** In: Bergey's manual of systematic bacteriology, p. 2106, Vol.3. Editado por Staley, J. Williams and Wilkins, Baltimore, 1989.
- STROHL, W. R., GEFFERS, I. & LARKIN, J. M. **Structure of the sulfur inclusion envelopes from four *Beggiatoas*.** Curr. Microbiol., 6, 75-79, 1981.
- SWEERTS, J. P. R. A., DE BEER, D., NIELSEN, L. P., VERDOUW, H., VAN DEN HEUVEL, J. C., COHEN, Y. & CAPPENBERG, T. E. **Denitrification by sulfur oxidizing *Beggiatoa* spp. mats on fresh-water sediments.** Nature, 344, 762-763, 1990.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0.** Mol. Biol. Evol., 24, 1596-1599, 2007.
- TESKE, A. & NELSON, D. C. **The genera *Beggiatoa* and *Thioploca*.** In: The prokaryotes, Vol. 3, 784-810, (3<sup>a</sup> Ed.). Editado por Dworkin, M., Falcow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stakebrandt, E., Springer-Verlag, Berlim, Alemanha, 2006.

TESKE, A., SOGIN, M. L., NIELSEN, L. P. & JANNASCH, H. W. **Phylogenetic relationships of a large marine *Beggiatoa***. Syst. Appl. Microbiol., 22, 39-44, 1999.

THAR, R. & FENCHEL, T. **Survey of motile microaerophilic bacterial morphotypes in the oxygen gradient above a marine sulfidic sediment**. Appl. Environ. Microbiol., 71, 3682-3691, 2005.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. **The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools**. Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882, 1997.

VARGAS, A. & STROHL, W. R. **Utilization of nitrate by *Beggiatoa alba***. Arch. Microbiol., 142, 279-284, 1985.

WÄLTERMANN, M. & STEINBÜCHEL, A. **Wax ester and triacylglycerol inclusions**. In: Inclusions in prokaryotes, 137-166. Editado por Shively, J. M., Springer-Verlag, Berlin, Alemanha, 2006.

WIRSEN, C. O. & JANNASH, H. W. **Physiological and morphological observations on *Thiovulum* sp.** J. Bacteriol., 136, 765-774, 1978.

YOUDEIRIAN, P. **Bacterial motility: secretory secrets of gliding bacteria**. Curr. Biol., 8, 408-411, 1998.

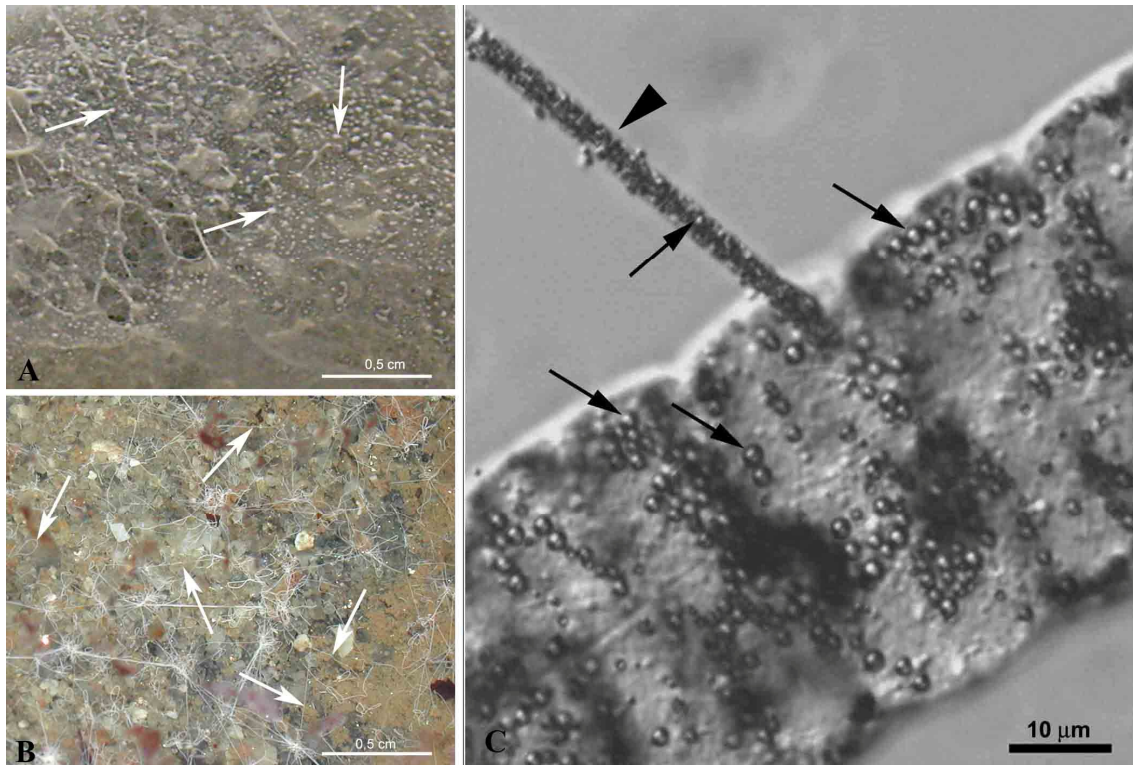


PRANCHAS

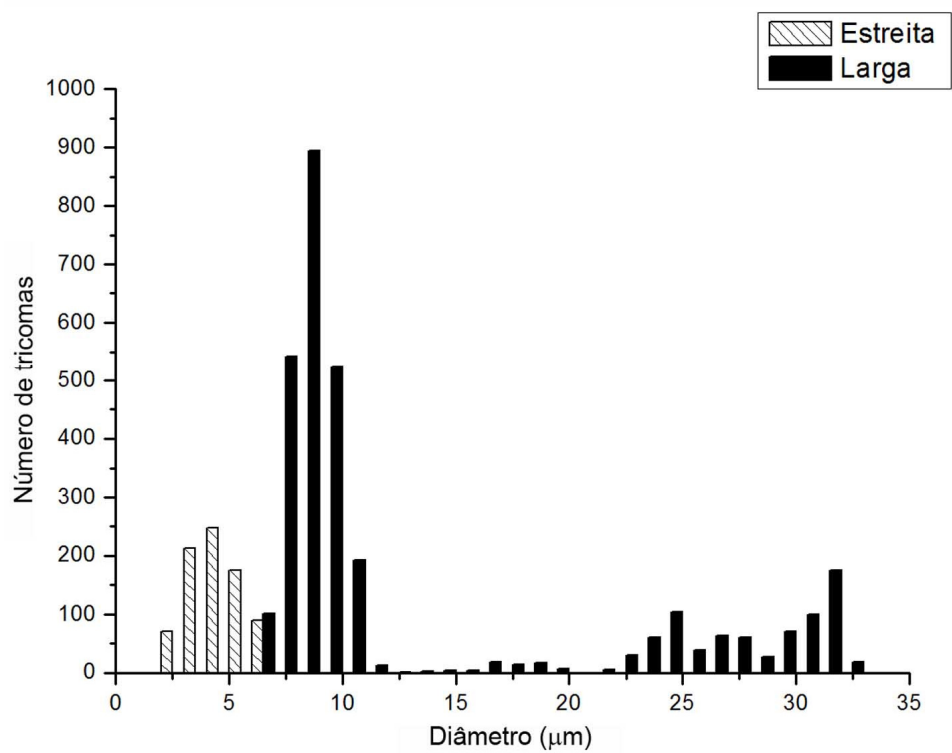
**Prancha 1. Populações de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre encontradas nas Lagoas de Araruama e Itaipu.**

**Figura 9:** (A) Bactérias filamentosas estreitas (Lagoa de Araruama), (B) bactérias filamentosas largas (Lagoa de Araruama). (C) Microscopia de luz com contraste diferencial interferencial mostrando a presença e a diferença de diâmetro entre uma bactéria filamentosa estreita (ponta de seta) e uma larga, e os seus respectivos glóbulos de enxofre (setas pretas).

**Figura 10:** Histograma construído a partir da análise conjunta dos diâmetros de filamentos provenientes das duas lagoas estudadas. O critério de separação entre as populações foi a presença de vacúolos intracitoplasmáticos.



**Figura 9**



**Figura 10**

**Prancha 2. Diferenças entre as populações de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre nas lagoas de Araruama e Itaipu.**

**Figura 11:** Histograma baseado nos diâmetros dos filamentos provenientes da Lagoa de Araruama.

**Figura 12:** Histograma baseado nos diâmetros dos filamentos provenientes da Lagoa de Itaipu.

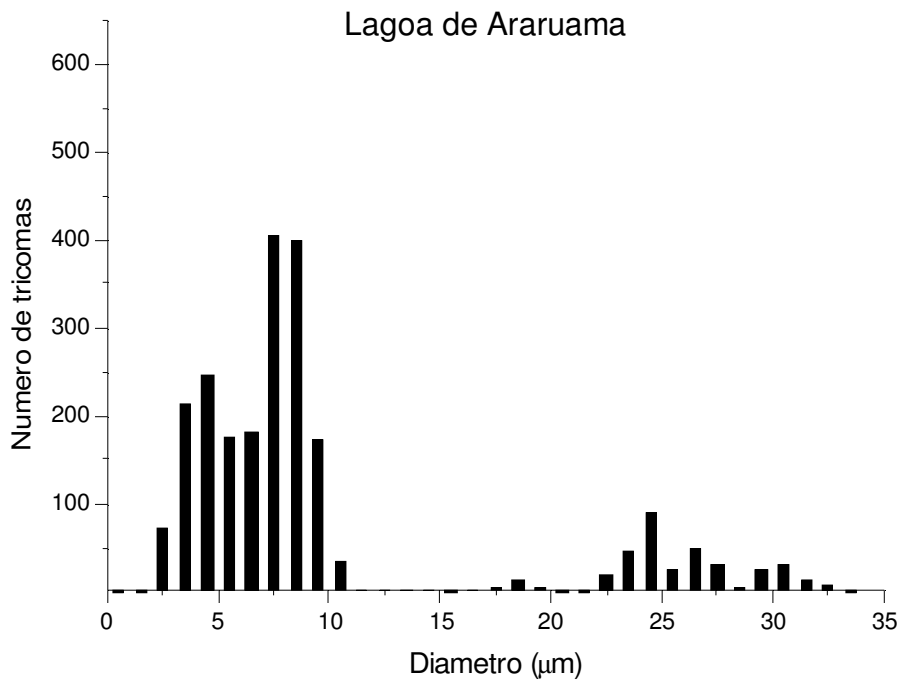


Figura 11

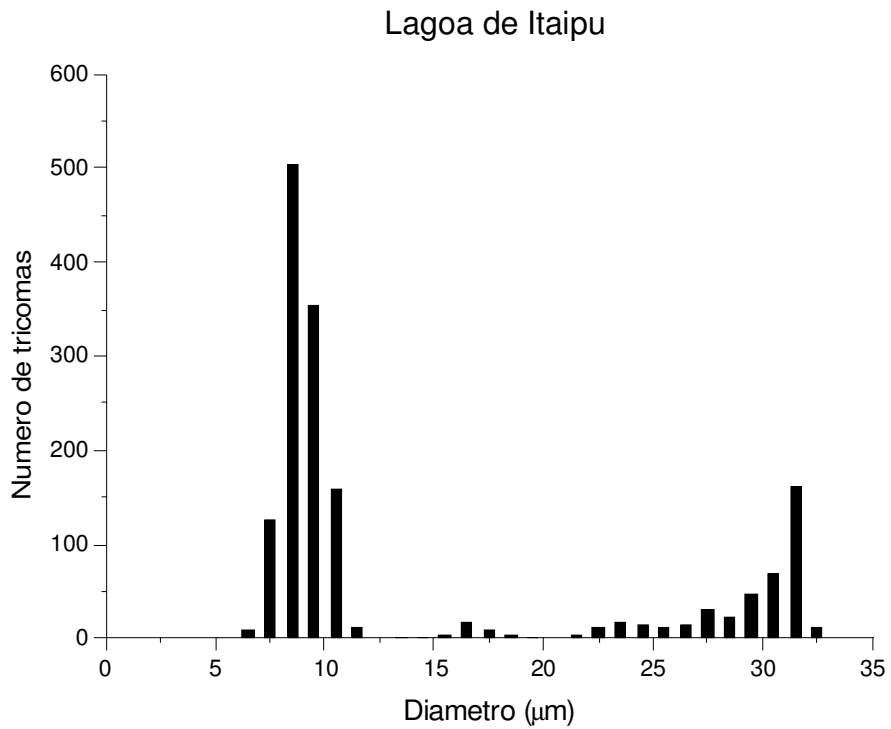


Figura 12

**Prancha 3. Microscopia eletrônica de transmissão, mostrando a superfície celular dos filamentos oxidantes de enxofre.**

**Figura 13:** (A) Corte ultrafino de amostra processada por método citoquímico, com a utilização de vermelho de rutênio, onde é possível observar a presença de fibrilas longitudinais na superfície celular (setas). (B) Contrastação negativa por PTA 2% mostrando também a presença de fibras na superfície celular (ponta de seta). (C) Micrografia de amostras processadas sem citoquímica mostrando a possível presença de um poro cruzado, local por onde poderia ocorrer a extrusão do muco (CC – circunferência de cruzamento; PC – poros cruzados). (D) Contrastação negativa onde se observa a extrusão do muco, a partir da região do septo, com clara indicação de sua direção (setas).

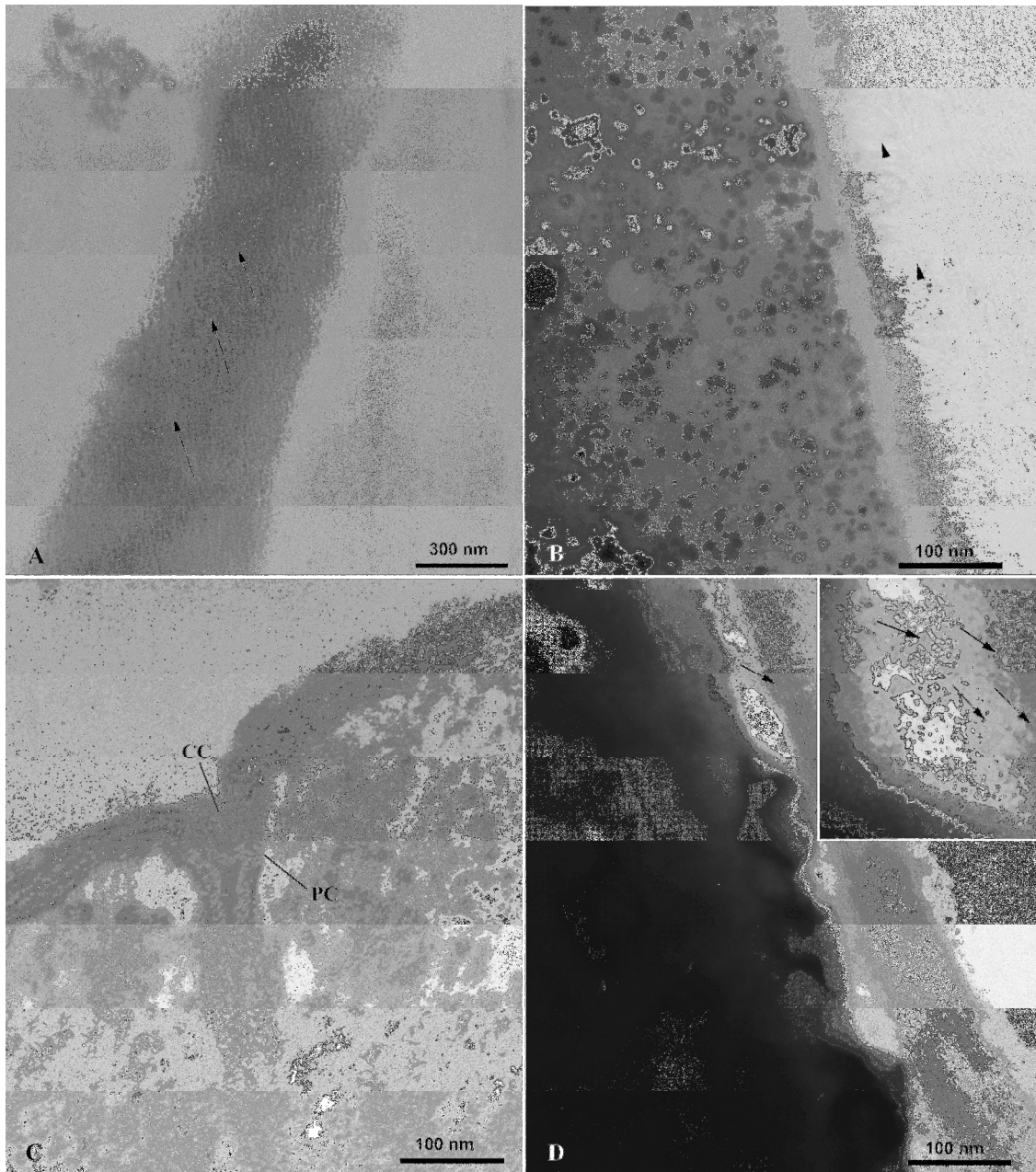


Figura 13

**Prancha 4. Micrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando a estrutura do envoltório celular dos dois tipos de filamentos.**

**Figura 14:** (A) Corte ultrafino de amostra processada como de rotina, mostrando a complexidade do envoltório celular de filamento estreito, composto por 5 camadas (*a, b, c, d, e*) (seta – membrana citoplasmática). (B) Corte ultrafino de amostra processada com substituição a frio, mostrando a formação do envelope celular de filamento largo por 4 camadas (*w, x, y, z*). (C) Formação do septo visualizado em amostra de filamentos estreitos processada como de rotina; membrana citoplasmática (seta) juntamente com a primeira camada do envelope “*a*”. Em ambos os morfotipos, o septo é formado pelos mesmos constituintes. (D) Presença do muco (M), liberado durante a locomoção, em amostra processada pela citoquímica com tetróxido de ósmio-ferrocianeto de potássio.



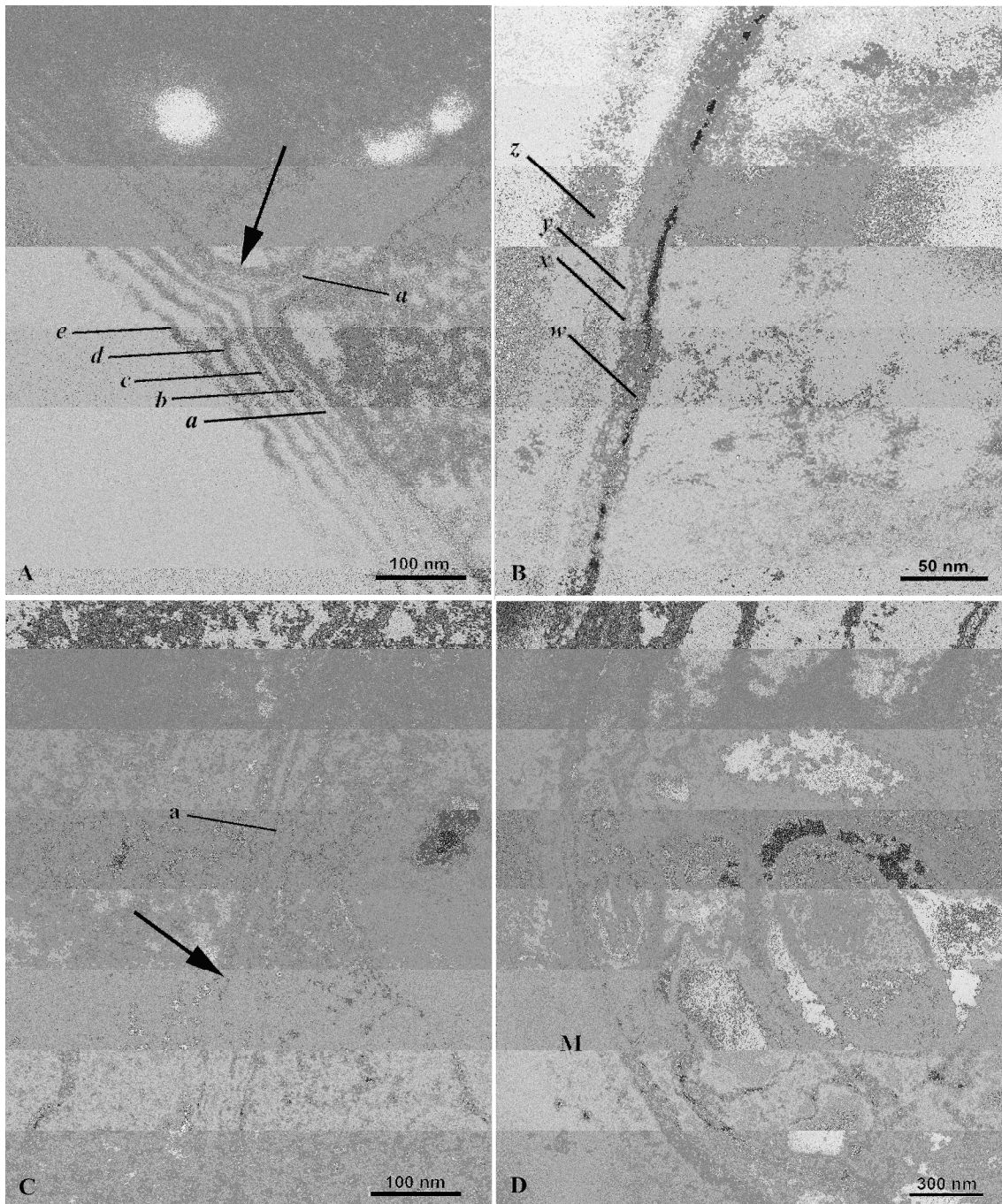


Figura 14

**Prancha 5. Filamentos oxidantes de enxofre estreitos e largos**

**Figura 15:** (A– C) DIC mostrando diferentes filamentos estreitos (2,4 a 6,5  $\mu\text{m}$ ) oxidantes de enxofre (setas: glóbulos de enxofre).

**Figura 16:** (A – D) DIC mostrando diferentes diâmetros e tipos dos filamentos largos (6,5 a 33  $\mu\text{m}$ ) oxidantes de enxofre (setas: glóbulos de enxofre; asteriscos: vacúolos intracitoplasmáticos).

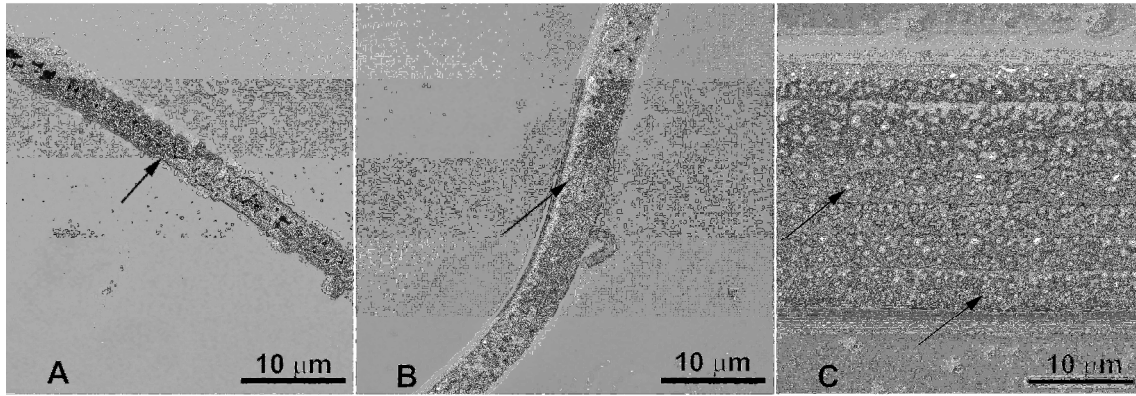


Figura 15

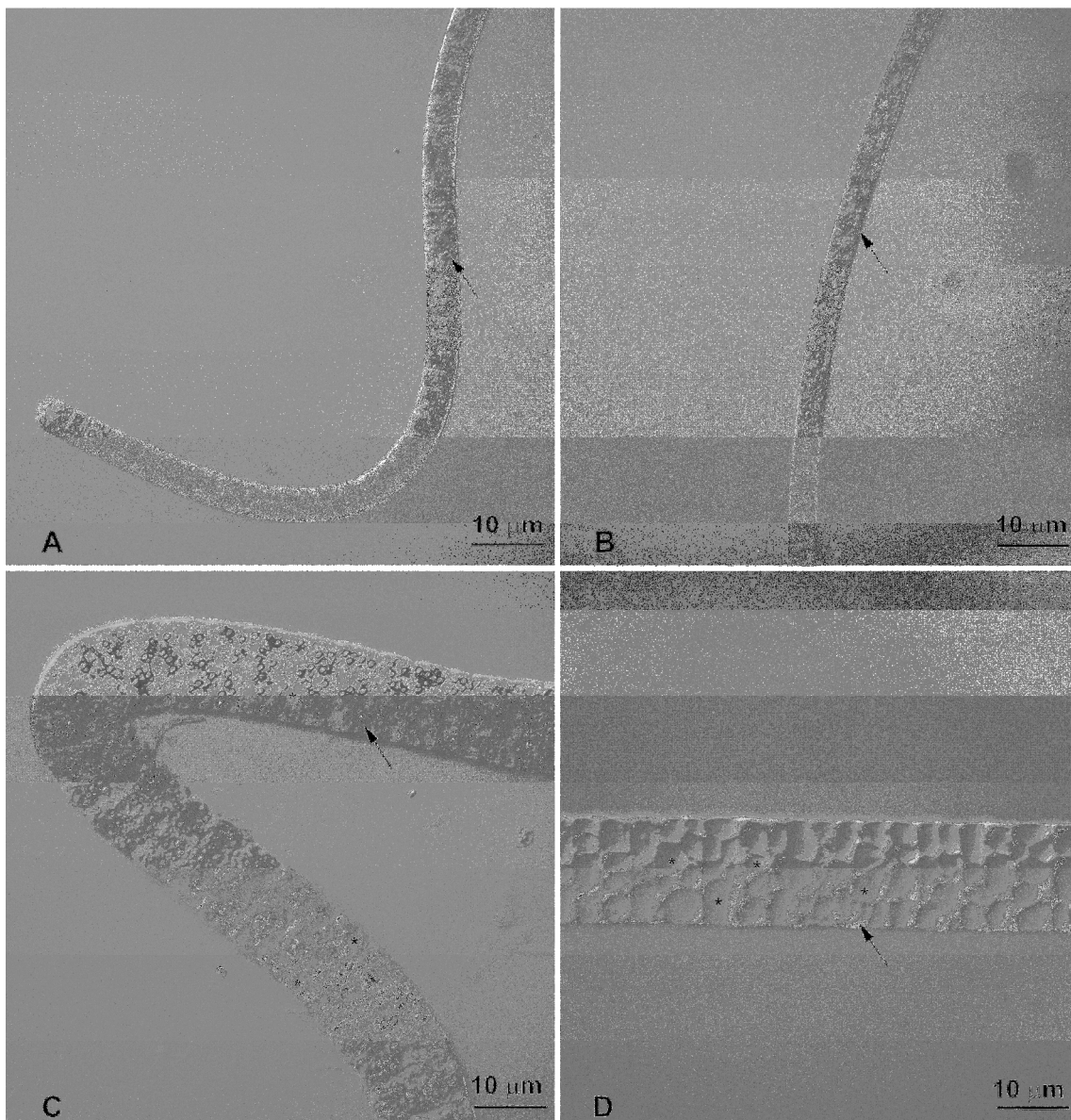


Figura 16

**Prancha 6. Microscopia confocal a laser (MCL) de filamentos corados com o corante lipofílico fluorescente FM 1-43<sup>®</sup>.**

**Figura 17:** (A) MCL da porção média de filamento estreito, mostrando os glóbulos de enxofre (setas), (B) Epi-reflexão, relativa à figura 17A, de filamento estreito onde é possível observar a distribuição dos glóbulos de enxofre (setas). (C) MCL da porção média de filamento largo, mostrando a presença dos septos entre as células individuais (ponta de seta), vacúolos intracitoplasmáticos (asterisco) e glóbulos de enxofre (seta). (D) Epi-reflexão, relativa à figura 17C, onde se observa a presença de glóbulos de enxofre na região periférica (seta). (E): Visualização da necrídia, célula de sacrifício formada no processo de divisão do filamento (seta de duas pontas, mostrando as direções opostas de locomoção do filamento durante o processo divisão). Também é possível observar na liberação dos vacúolos intracitoplasmáticos (asterisco), que estes possuem algum tipo de envoltório que os separa do citoplasma da célula. (F1-F15) Série de cortes obtidos de filamento largo (1-1  $\mu\text{m}$ ) mostrando, ao longo da série, a localização periférica dos glóbulos de enxofre (seta), a presença dos vacúolos intracitoplasmáticos em diferentes quantidades por célula individual (asterisco) e o septo entre as células individuais (ponta de seta). É possível observar que, em alguns cortes, o septo parece descontínuo, sugerindo ser esta uma fonte de comunicação intercelular.

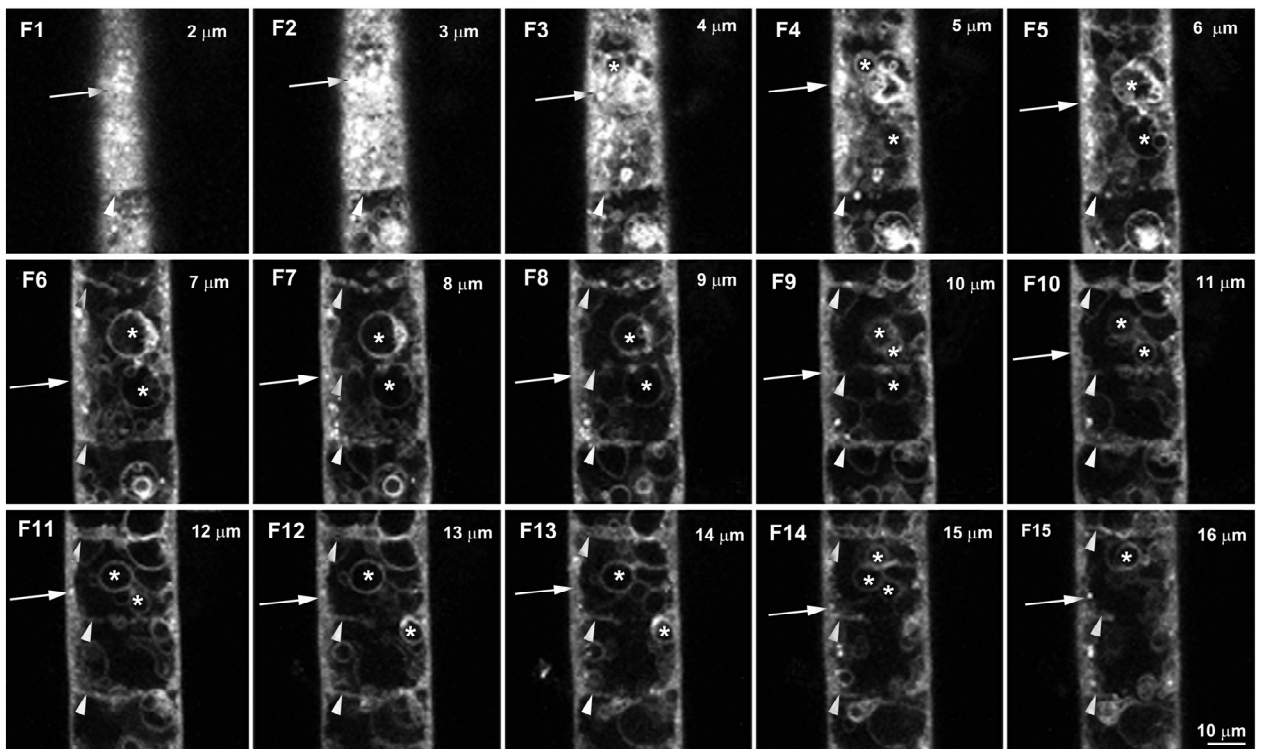
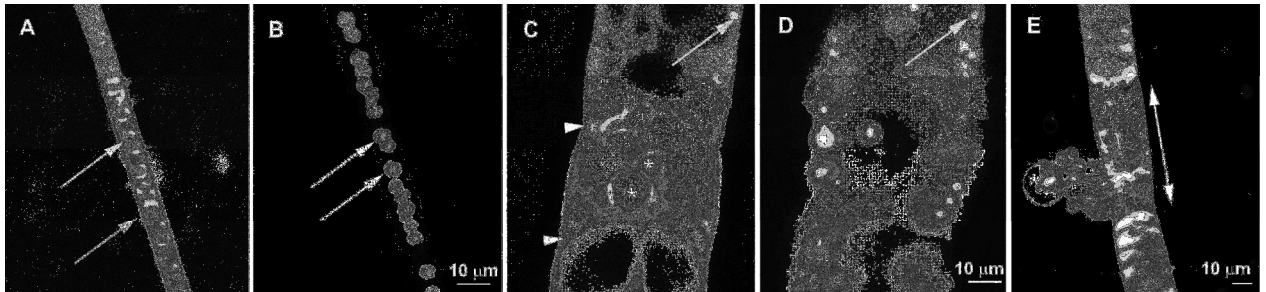


Figura 17

**Prancha 7. MET /Microanálise de raios-X.**

**Figura 18:** (A) Micrografia de filamento estreito, sem contrastação, onde é possível observar a presença de dois tipos de inclusão: uma eletrondensa (grânulo de polifosfato) e outra eletronlucente (glóbulo de enxofre). (B) Microanálise de raios-X do grânulo eletrondenso do filamento estreito, mostrando que é rico em fósforo. (C) Microanálise de raios-X do grânulo eletronlucente do filamento estreito, comprovando que este contém enxofre.

**Figura 19:** (A) Micrografia de filamento largo, sem contrastação, mostrando a presença de glóbulos de enxofre (seta). (B) Microanálise de raios-X dos grânulos de enxofre presentes nos filamentos largos.

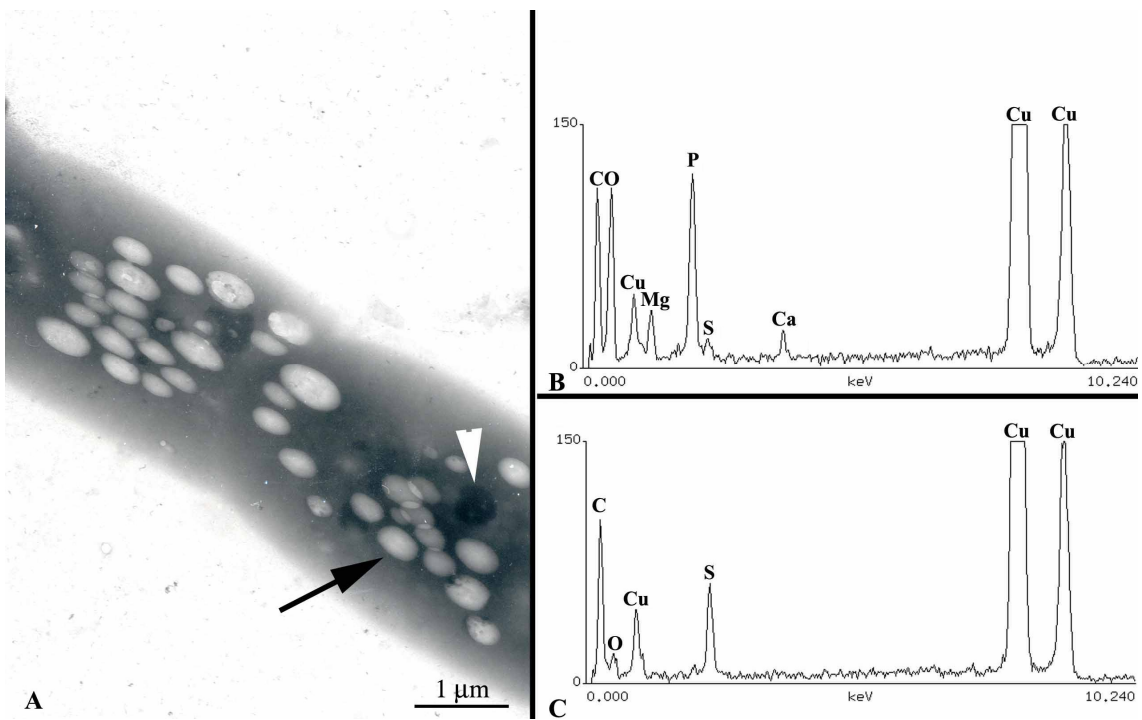


Figura 18

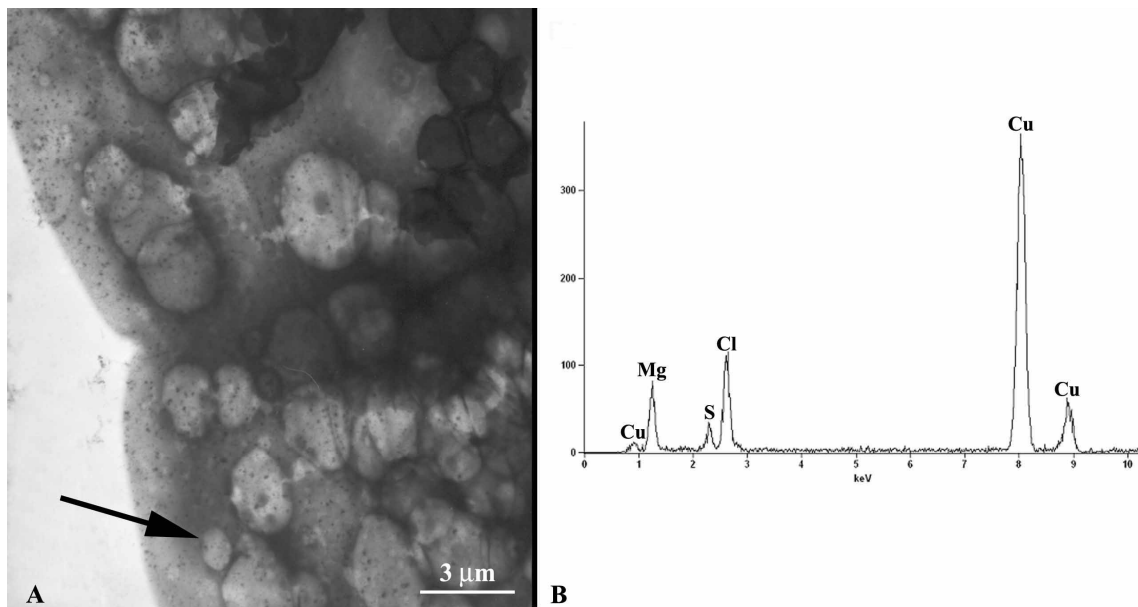


Figura 19

**Prancha 8. Microscopia eletrônica mostrando os diferentes tipos de inclusões presentes nos filamentos de bactérias oxidantes de enxofre:**

**Figura 20:** (A) Microscopia eletrônica de varredura de filamento largo onde se observa o septo (seta) e grânulos de enxofre (asterisco). Os grandes vacúolos intracitoplasmáticos não podem ser vistos provavelmente por terem sido extraídos durante o processamento. (B) MET de filamento estreito processado por substituição a frio onde é possível observar grânulos eletrondensos (asteriscos), provavelmente corpos de inclusão ricos em polifosfato, como identificados na microanálise de raios-X. (C) Filamento largo processado como de rotina. Observamos a estreita relação da membrana citoplasmática (seta) com a inclusão eletrólucida (S), provavelmente composta por enxofre. (D) Método citoquímico para detecção de lipídeo insaturado (ósio-imidazol) onde é possível observar o grânulo eletrólucido (S) em estreita relação com a membrana citoplasmática (seta). (E) Método citoquímico para localização de cálcio (ferrocianeto de potássio) onde observamos grânulos levemente eletrondensos, circundados pela membrana citoplasmática (seta). Pela localização periplásmica provavelmente são grânulos de enxofre, apesar do aspecto radiado do interior. (F) Micrografia de filamentos largos mostrando outras inclusões eletrondensas, também no espaço periplásmico, juntamente com os glóbulos de enxofre (S). (G) Micrografia de filamento processado com vermelho de rutênio, onde é possível observar a presença de um grânulo bastante eletrondenso, possivelmente composto por carboidrato ácido.



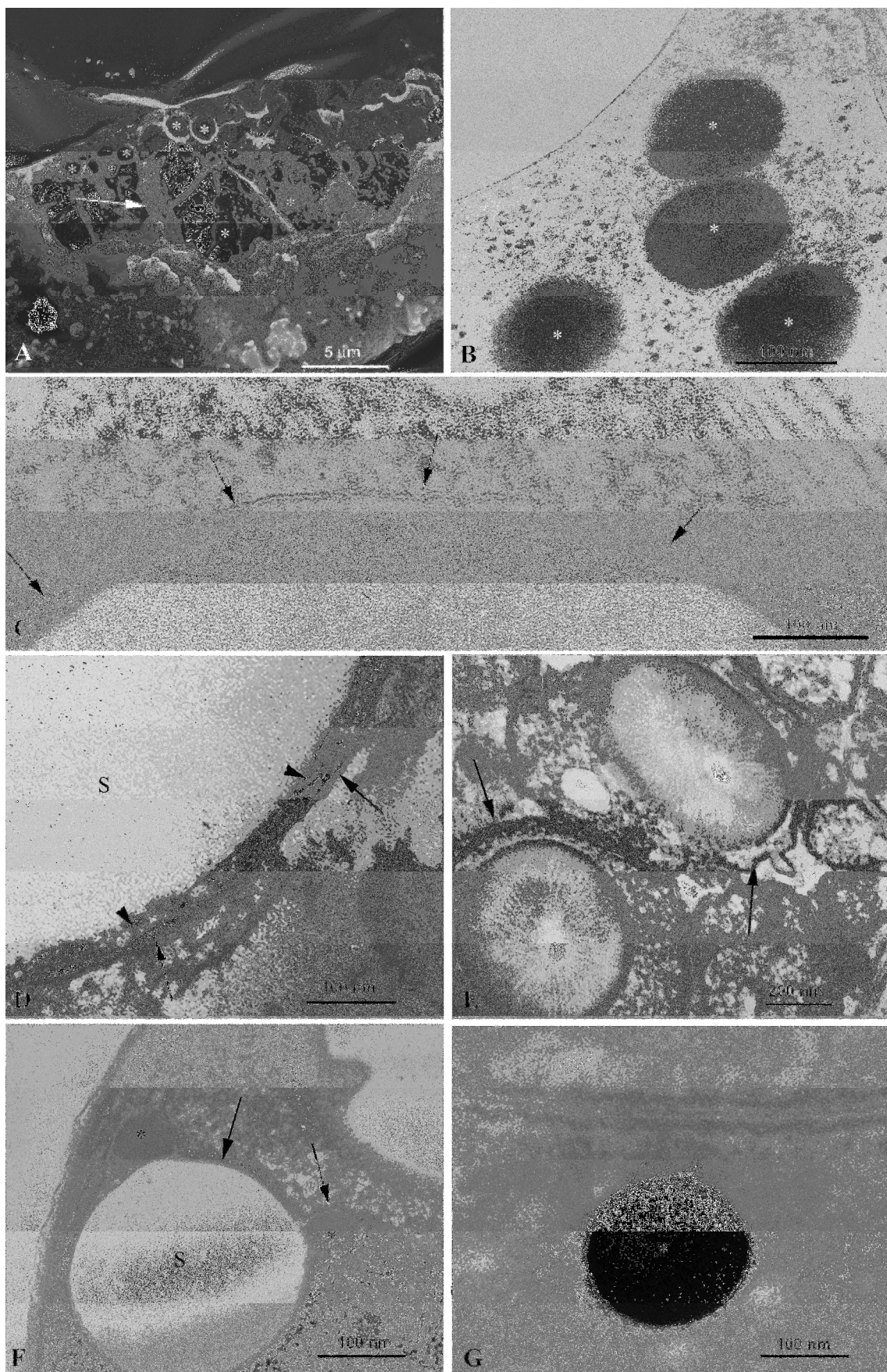
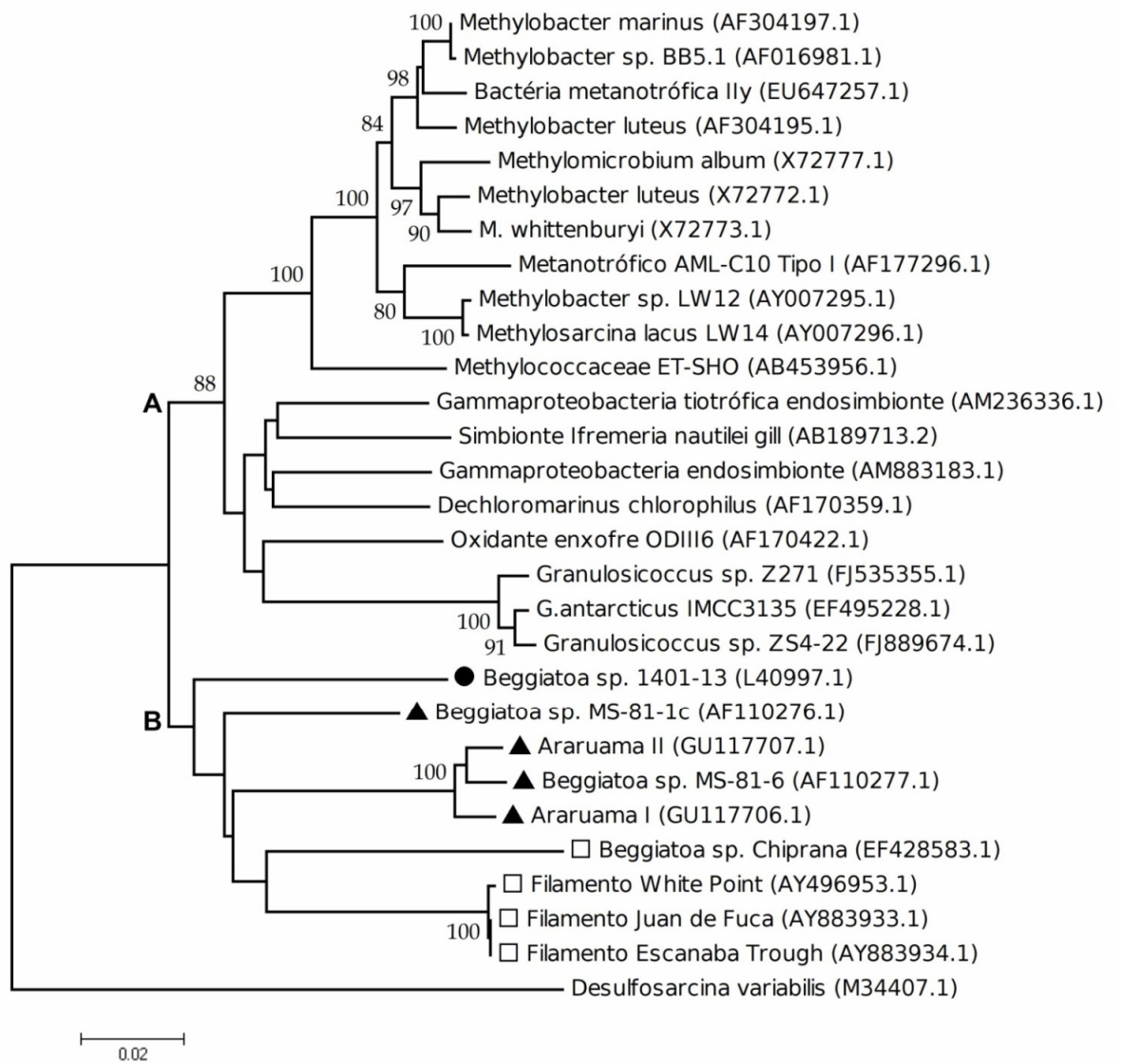


Figura 20

**Prancha 9. Análises filogenéticas das bactérias filamentosas não-vacuoladas oxidantes de enxofre encontradas na Lagoa de Araruama, baseadas em análise do gene *rrs*.**

**Figura 21:** Árvore filogenética baseada na análise do gene *rrs* mostrando a relação entre os tricomas não-vacuolados da Lagoa de Araruama e sequências obtidas do banco de dados RDP (SeqMatch). Esta árvore foi construída por “neighbor-joining” utilizando o número de diferenças como modelo de distância. Os valores de “bootstrap” superiores a 50% estão representados em cada nó da árvore. (A) *Gammaproteobacteria* marinha; (B) Bactérias filamentosas oxidantes de enxofre (▲ *Beggiatoa* marinhas ‘estretas’, □ Bactérias marinhas oxidantes de enxofre ‘largas’, ● *Beggiatoa* água doce).



**Figura 21**

**Prancha 10. Análises filogenéticas das bactérias filamentosas não-vacuoladas oxidantes de enxofre encontradas na Lagoa de Araruama, baseadas em análise do gene *rrs*.**

**Figura 22:** Árvore filogenética baseada na análise do gene *rrs* mostrando a relação entre os tricomas não-vacuolados da Lagoa de Araruama e os primeiros 40 hits obtidos a partir do alinhamento, com sequências do banco de dados do NCBI (GenBank Database) através da ferramenta BLAST. Esta árvore foi construída por “neighbor-joining” utilizando o número de diferenças como modelo de distância. Os valores de “bootstrap” superiores a 50% estão representados em cada nó da árvore. (A) *Gammaproteobacteria* marinhas; (B) Bactérias filamentosas oxidantes de enxofre (▲ *Beggiatoa* marinhas ‘estreitas’, □ Bactérias marinhas oxidantes de enxofre ‘largas’).

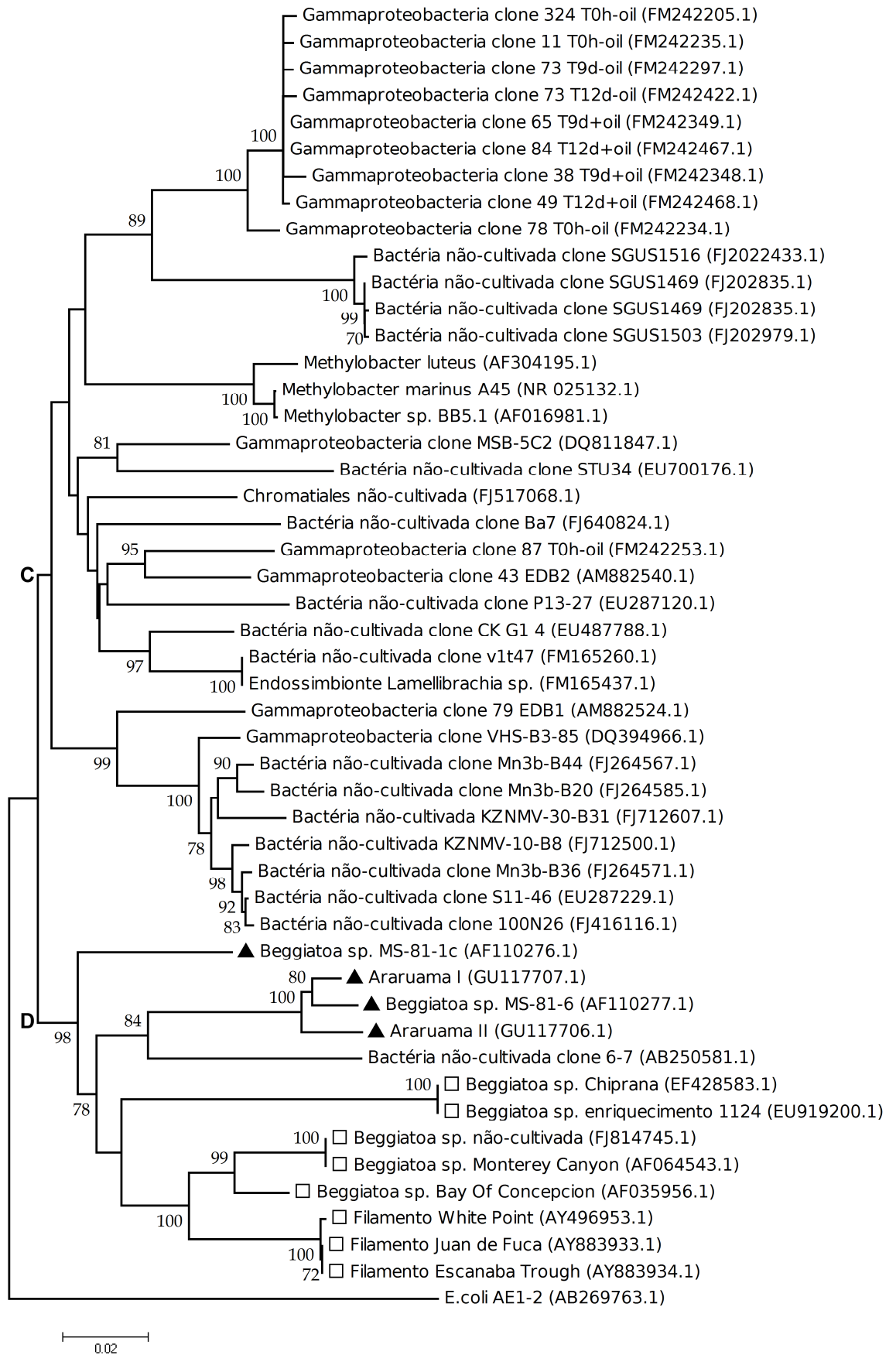
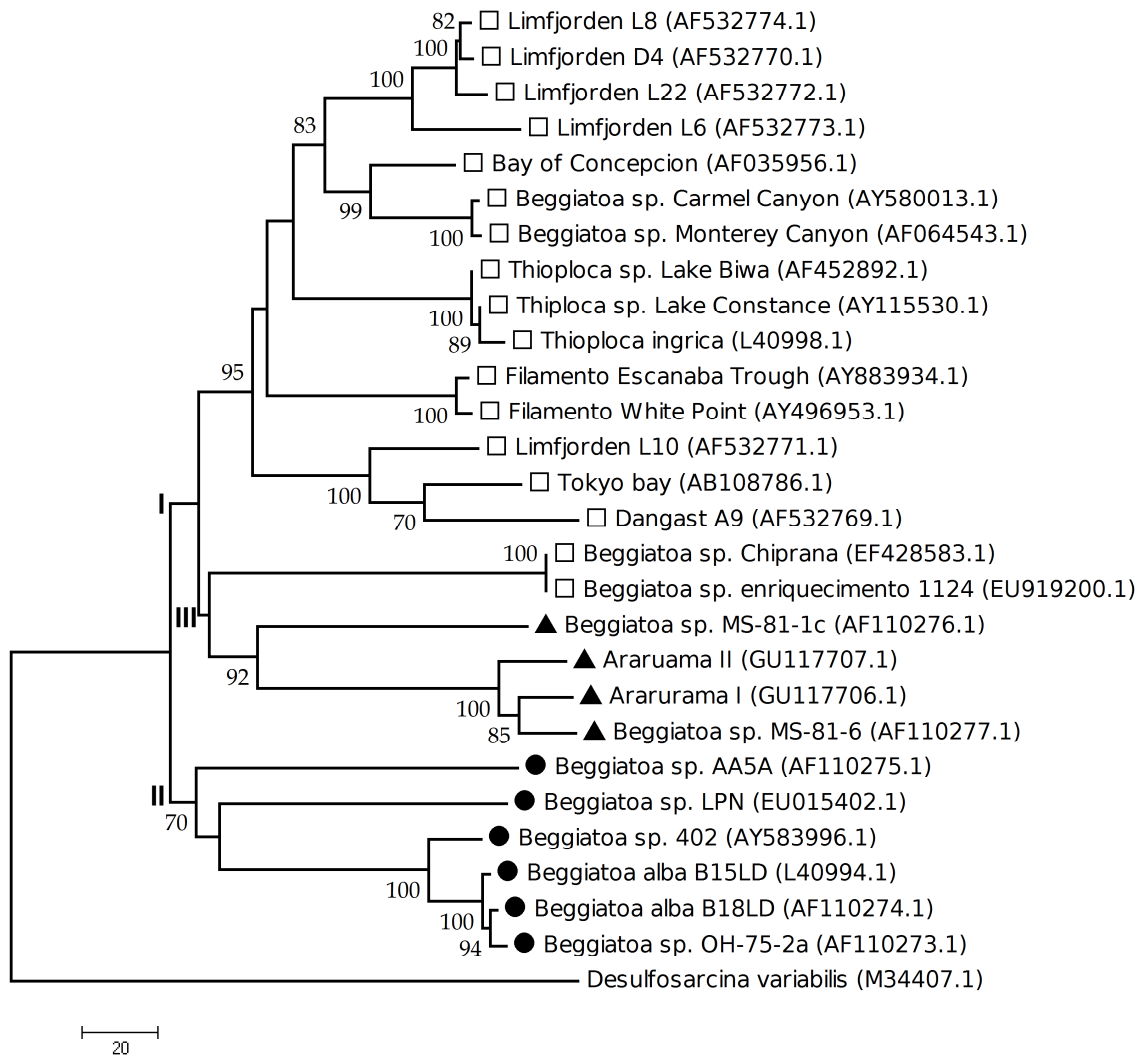


Figura 22

**Prancha 11. Análises filogenéticas das bactérias filamentosas não-vacuoladas oxidantes de enxofre encontradas na Lagoa de Araruama, baseadas em análise do gene *rrs*.**

**Figura 23:** Árvore filogenética baseada na análise do gene *rrs* mostrando a relação entre os tricomas não-vacuolados da Lagoa de Araruama e sequências de bactérias filamentosas oxidantes de enxofre do banco de dados do NCBI (GenBank Database), através da ferramenta BLAST. Esta árvore foi construída por “neighbor-joining” utilizando máxima-verossimilhança como modelo de distância. Os valores de “bootstrap” superiores a 50% estão representados em cada nó da árvore. (I) Bactérias filamentosas oxidantes de enxofre, (II) *Beggiatoa* água doce ‘estreitas’, (III) *Beggiatoa* marinhas/hipersalinas ‘estreitas’ (□ Bactérias marinhas oxidantes de enxofre largas/vacuoladas, ▲ *Beggiatoa* marinhas estreitas/não-vacuoladas, ● *Beggiatoa* água doce).

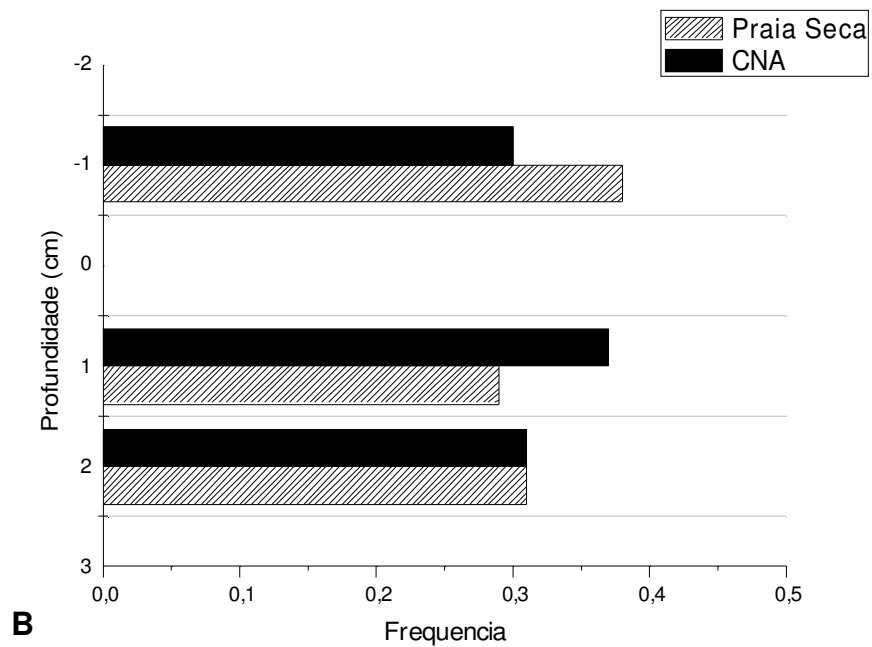
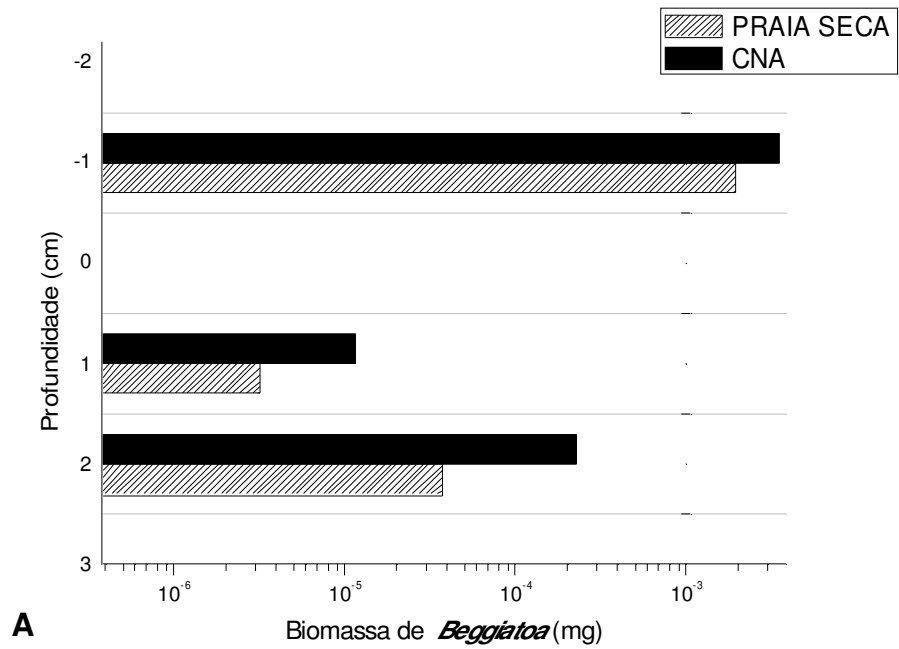


**Figura 23**

**Prancha 12. Distribuição da biomassa de *Beggiatoa* sp. em sedimento da Lagoa de Araruama, amostrados em dois pontos distintos, em Cabo Frio e em Praia Seca. O ponto ZERO é a região de interface água/sedimento.**

**Figura 24:** (A) Distribuição da população de *Beggiatoa* sp. no mês de Setembro/2008, onde observa-se a maior biomassa na coluna d'água. (B) Frequência da distribuição dos filamentos de *Beggiatoa* sp. referente à coleta de Setembro/2008.

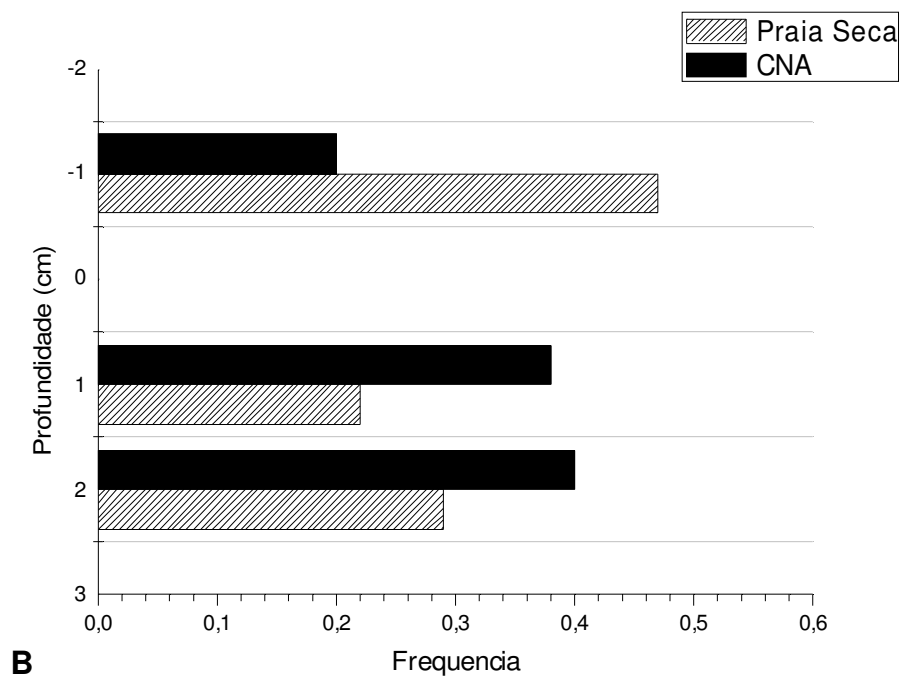
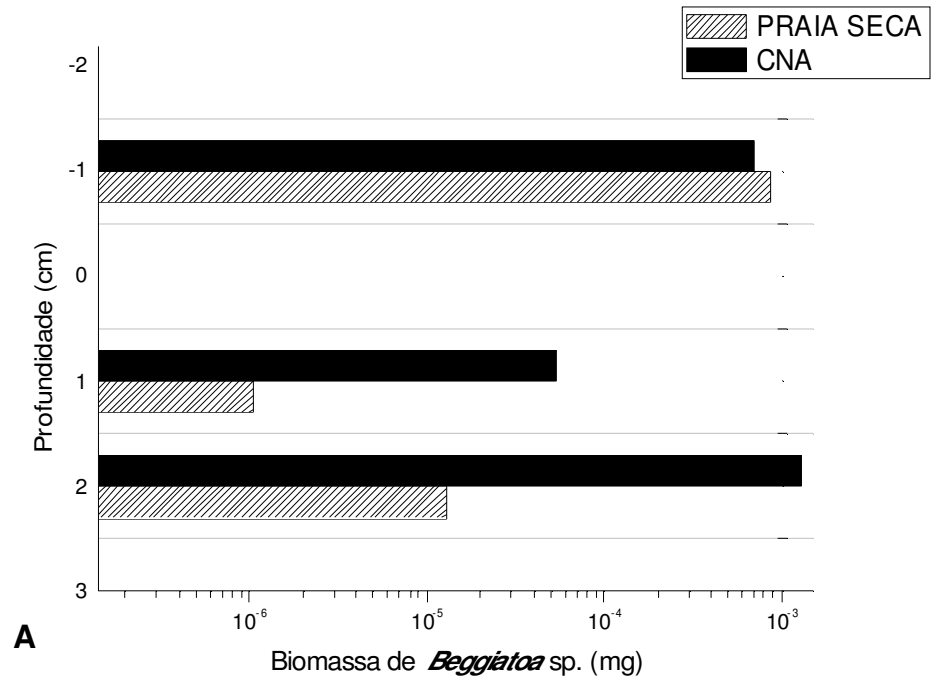




**Figura 24**

**Prancha 13. Distribuição da biomassa de *Beggiatoa* sp. em sedimento da Lagoa de Araruama, amostrados em dois pontos distintos, em Cabo Frio e em Praia Seca. O ponto ZERO é a região de interface água/sedimento.**

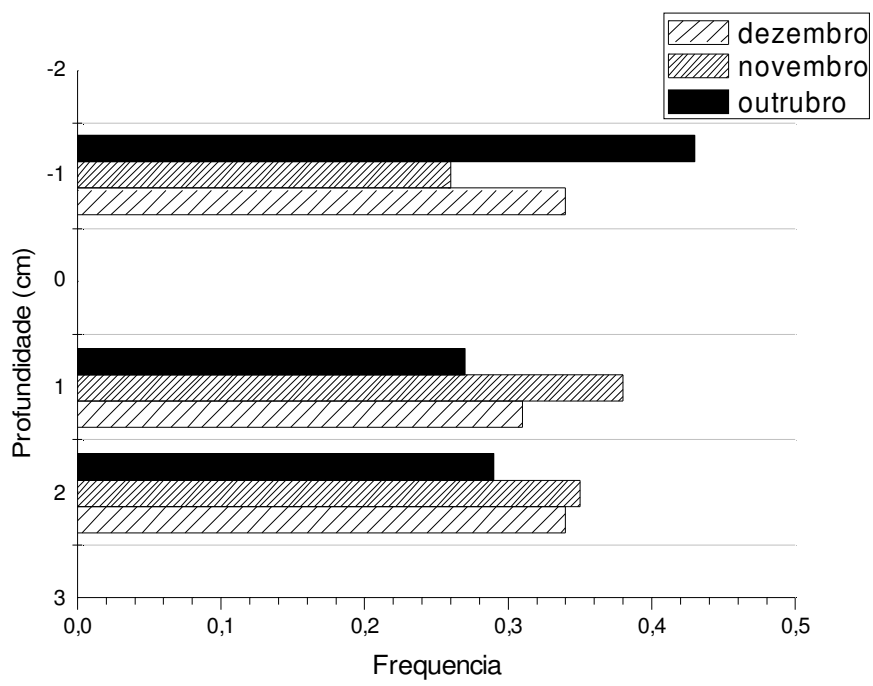
**Figura 25:** (A) Distribuição da população de *Beggiatoa* sp. no mês de Janeiro/2009, onde observa-se uma maior biomassa na coluna d'água. (B) Frequência da distribuição dos filamentos de *Beggiatoa* sp. referente à coleta de Janeiro/2009.



**Figura 25**

**Prancha 14. Distribuição da biomassa de *Beggiatoa* sp. em sedimento da Lagoa de Araruama, amostrados em dois pontos distintos, em Cabo Frio e em Praia Seca. O ponto ZERO é a região de interface água/sedimento.**

**Figura 26:** Frequência da distribuição dos filamentos de *Beggiatoa* sp. em amostras da Lagoa de Araruama (canal da CNA) nos meses de outubro, novembro e dezembro/2008.



**Figura 26**

## ANEXO

Publicação referente à tese de doutorado, aceita pela revista indexada “Micron” – *in press*, 2010.

Comparative analysis of *Beggiatoa* from hypersaline and marine environments

Julia Peixoto de Albuquerque, Carolina Neumann Keim and Ulysses Lins\*

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Centro de Ciências de Saúde, Bloco I, 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil

\* Corresponding author: Ulysses Lins

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro  
– Av. Carlos Chagas Filho, 373, Edifício do CCS, Bloco I, Cidade Universitária, Rio de  
Janeiro, RJ, 21941-902, Brasil

Tel: (+55-21)2562-6738; Fax: (+55-21) 2560-8344

e-mail: [ulins@micro.ufrj.br](mailto:ulins@micro.ufrj.br); [ulysses.lins@gmail.com](mailto:ulysses.lins@gmail.com)

**Abstract**

The main criterion to classify a microorganism as belonging to the genus *Beggiatoa* is its morphology. All multicellular, colorless, gliding bacterial filaments containing sulfur globules described so far belong to this genus. At the ultrastructural level, they show also a very complex cell envelope structure. Here we describe uncultured vacuolated and non-vacuolated bacteria from two different environments showing all characteristics necessary to assign a bacterium to the genus *Beggiatoa*. We also intended to investigate whether narrow and vacuolate *Beggiatoa* do differ morphologically as much as they do phylogenetically. Both large, vacuolated trichomes and narrow filaments devoid of vacuoles were observed. We confirmed the identity of the narrow filaments by 16S rRNA phylogenetic analysis. The diameters of the trichomes ranged from 2.4 to 34  $\mu\text{m}$ , and their lengths ranged from 10  $\mu\text{m}$  to over 30 mm. Narrow trichomes moved by gliding at 3.0  $\mu\text{m/s}$ ; large filaments moved at 1.5  $\mu\text{m/s}$ . Periplasmic sulfur inclusions were observed in both types of filaments, whereas phosphorus-rich bodies were found only in narrow trichomes. On the other hand, nitrate vacuoles were observed only in large trichomes. Ultra-thin section transmission electron microscopy showed differences between the cell ultrastructure of narrow (non-vacuolated) and large (vacuolated) *Beggiatoa*. We observed that cell envelopes from narrow *Beggiatoa* consist of five layers, whereas cell envelopes from large trichomes contain four layers.

**Keywords:** *Beggiatoa*, ultrastructure, cytochemistry, sulfide-oxidizing filamentous bacteria



## 1. Introduction

Filamentous, gliding, sulfide-oxidizing bacteria belonging to the genus *Beggiatoa* are widespread in a variety of environments, assembling macroscopically visible mats. These environments range from freshwater to hypersaline and contain detectable levels of hydrogen sulfide [1]. Sulfide/oxygen gradients occur in stratified water bodies as well as in soils and sediments. Such gradients can range in size from a few hundred micrometers thick, in a microbial mat or sediment surface, to several meters in a stratified body of water. The filaments or trichomes are commonly located in the suboxic zone, where neither sulfide nor oxygen is present at detectable levels, and they migrate through this gradient according to the availability of electron donors and acceptors [2,3]. Large vacuolate nitrate-storing *Beggiatoa* are anaerobes that move between non-overlapping nitrate-rich and sulfide-rich sediment layers, as they use nitrate as an electron acceptor for sulfide oxidation [4,5]. Because of the abundance of nitrate-storing sulfur bacteria, their activities play an important role in the sulfur and nitrogen cycles [6].

Ahmad, Kalanetra and Nelson [7] defined the phylogenetic root of morphologically diverse, non-cultured, vacuolate sulfur bacteria; a close phylogenetic relationship was found among all wide, vacuolate sulfur filamentous bacteria, supporting the morphologic data as a tool for identification of members from this group of microorganisms. Most *Beggiatoa* are uncultured and only a single species, the narrow, freshwater *Beggiatoa alba*, is currently recognized [8].

The ultrastructure of these filamentous bacteria is especially interesting. The cell surface of the freshwater species *Beggiatoa alba* consists of a multi-layered envelope that is continuous over the entire filament; the individual cells are separated only by the cytoplasmic membrane plus the inner layer of the trichome envelope [9]. Both narrow

and large filaments of *Beggiatoa* sp. contain sulfur globules in their periplasm, forming invaginations of the plasma membrane. In addition, intracytoplasmic vacuoles fill most of the cell in the large *Beggiatoa* sp., although there is no clear indication of a membrane separating the cytoplasm from the liquid vacuole content [10].

Filaments of *Beggiatoa* sp. move by gliding, but there is no clear information on the mechanism of motility. A trail of mucilage is expelled, inside which the trichomes glide, and linearly arranged longitudinal fibrils have been observed on the surface layer [9]. In the narrow, cultivated species *Beggiatoa alba*, the mucilage trail is composed of neutral polysaccharides (mannose and glucose) [11], but there are no studies showing how the polysaccharides extrusion occurs. Thin sectioning and freeze-etching techniques have shown a complex five-layered cell envelope in the narrow freshwater filaments of *Beggiatoa alba* strain B15LD [9].

There are few reports of *Beggiatoa* sp. found in hypersaline environments; most of these microorganisms have been found at hydrothermal vents or in the deep sea [10,12]. Previous ultrastructural studies have been done on the small, freshwater, readily culturable, non-vacuolated *B. alba*, a species that is phylogenetically distant from the large sulfur-oxidizing bacteria [7,9]. For several years, morphological features had been the only criterion evaluated for classification of filamentous, colorless, sulfide oxidizing bacteria as belonging to the genus *Beggiatoa*, because of their unique morphological characteristics.

Here, we describe both narrow and large filamentous, gliding, sulfide-oxidizing bacteria from two coastal lagoons, namely Araruama and Itaipu Lagoons, on the east coast of Rio de Janeiro State, Brazil. The characteristic morphology and motility of these bacteria allowed them to be classified as belonging to the genus *Beggiatoa*. Ultrastructural studies showed differences in both the cytoplasmic organization and in

the cell envelope between narrow and large trichomes. In addition, we confirmed the identity of narrow trichomes of Araruama Lagoon as *Beggiatoa* sp. by 16S rRNA sequencing.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Sampling

Sediment and water were collected at Araruama Lagoon (22°50'S x 42°13'W) and Itaipu Lagoon (22°57'S x 43°04'W), which are coastal lagoons in Rio de Janeiro State, Brazil. As a result of a semi-arid climate and a negative water balance, Araruama Lagoon is a permanently moderately hypersaline lagoon [13], whereas Itaipu Lagoon is a marine lagoon [14].

Samples were stored in loosely capped bottles in the laboratory at room temperature (25°C), under dim light. After 7 days, the sediment surface was covered with white mats containing sulfide-oxidizing filaments (trichomes). Samples of these mats were collected gently with a Pasteur pipette and suspended in Millipore filtered (0.22 µm) lagoon water.

### 2.2 Light Microscopy

After the visual separation between narrow and large trichomes from the samples with a needle, under a SZ51 Stereo Microscope (Olympus), the filaments were observed with phase contrast, differential interferential contrast (DIC) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Living samples were observed with a Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss MicroImaging) and the movement was tape recorded and later digitized with Studio 8 ATI software (version 8.0, Pinnacle Systems). Time-lapse movies were screened for sequences where *Beggiatoa* trichomes glided parallel to the image plane of the camera. Single images of the movie sequences were analyzed as previously described [15], with ImageJ 1.34n (National Institutes of Health, USA) or AnalySIS® (SIS, GmbH, Germany) software. For confocal microscopy, trichomes were fixed in 4% formaldehyde in 100 mM cacodylate buffer (pH 7.2) in lagoon water, stained with the lipophilic fluorescent dye FM<sup>®</sup> 1-43 (Molecular Probes, Inc.) (5.0

$\mu\text{g/mL}$ ) and imaged with a LSM 510 Confocal Scanning Microscope (Carl Zeiss MicroImaging) with a 488-nm argon laser. Each image was taken in one *XY* plane, and multiple *XY* sections were taken throughout the depth of a trichome at 1.0  $\mu\text{m}$  *Z* intervals.

### **2.3 Scanning Electron Microscopy**

For scanning electron microscopy, filaments were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 100 mM cacodylate buffer (pH 7.2) in lagoon water, at 4°C overnight, washed twice in the same buffer, post-fixed in buffered 1%  $\text{OsO}_4$  for 1 hour, incubated in 1% tannic acid for 1 hour, dehydrated in an ethanol series and critical point dried with  $\text{CO}_2$  in a Balzers CPD 030 apparatus. Single filaments were adhered on a double stick tape attached to aluminum stubs for scanning electron microscopy. Then, adhesive tape was pressed gently onto the surface of the specimen and pulled to strip away the uppermost layers [16]. Samples were then gold sputtered in a Balzer Inc. apparatus and imaged with a JEOL JSM35 scanning electron microscope operating at 15 kV.

### **2.4 Transmission Electron Microscopy**

For freeze substitution, filaments were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 100 mM cacodylate buffer (pH 7.2) in lagoon water, at 4°C overnight, infiltrated with 20% glycerol for cryoprotection, plunge frozen in Freon 22 and then transferred to liquid nitrogen. The infiltration solution consisted of 2% uranyl acetate and 1% glutaraldehyde, in acetone, and the substitution cycle was: -90°C/72 h, 1°C/h up to -35°C; -35°C/48 h, 2°C/h up to -20°C; -20°C/24 h and 4°C/24 h (Leica AFS Freeze-Substitution System). Samples were embedded in Polybed 812, with a serial infiltration of acetone: Polybed 812 (3:1, 24 h; 2:1, 24 h; 1:1 24 h; 1:2, 24 h; 1:3, 24 h; pure Polybed 812, 24 h; polymerization were done at 60°C). Ultra-thin sections were

obtained with routine and en bloc uranyl acetate (2%) protocols. Both procedures were done with chemically fixed filaments, as described for freeze substitution, followed by 1% osmium tetroxide post-fixation, acetone series dehydration and embedding in Polybed 812. For “en bloc” uranyl acetate staining, the protocol included an additional 2% uranyl acetate post-fixation step. In some samples, calcium chloride was added in buffer solutions during fixation and post-fixation as previously described [18, 19], to improve ultrastructural preservation. For cytochemistry, trichomes were chemically fixed as described for freeze substitution, with modifications for each method: imidazole-buffered OsO<sub>4</sub> post-fixation was done as described by Angermüller and Fahimi [17].

For negative staining, samples were deposited on formvar-coated copper grids, washed five times with Millipore filtered (0.22 µm) lagoon water and then in distilled water to remove salt crystals and air-dried; negative staining was done by applying a 2% phosphotungstic acid solution for 30 seconds followed by drying with filter paper. All samples were observed with a FEI Morgagni transmission electron microscope, operating at 80 kV. For X-ray microanalysis, unfixed samples were deposited on formvar-coated copper grids, gently rinsed with distilled water, air-dried and then analyzed with a JEOL 1200 or JEOL 2000 FX TEM microscope, operating at 120 or 200 kV, both equipped with an EDX Noran system.

## **2.5 DNA isolation for molecular analysis**

The filamentous bacteria with morphological characteristics of *Beggiatoa* previously suspended in 0.22 µm Millipore filtered water were transferred with sterilized needles to a sterilized glass slide containing sterilized water. Then, the samples were aseptically transferred to a sterile 1.5 mL tube, suspended in sterile 1X TE and submitted to freezing steps for cell rupture and liberation of DNA.

PCR was done as described by Éden et al. [20], with a hot-start of 94°C for 1 min. After PCR, *rrs* gene fragments were purified with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). PCR products of 1500 bp obtained from amplified *rrs* gene were cloned using the InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. After transformation of *E. coli* DH5α competent cells, clones were picked, and the presence of inserts of the expected size was assessed. Selected clones were then sequenced using the M13f and M13r primers and an ABI Prism 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The consensus sequence from each 16S rRNA clone was obtained and analyzed by Sequence Match to find the closest sequences with more than 1200 bp from the curated RDP database. All hits obtained from RDP were aligned with the 16S rRNA sequences recovered from Araruama Lagoon, using Clustal X software [21]. We also compared our consensus sequences with the closest sequences obtained from the NCBI GenBank database by BLAST-N and aligned, as described before. The GenBank database is larger than the RDP database but non-curated.

## **2.6 Phylogenetic analysis**

After alignment of the sequences, phylogenetic trees were constructed with the MEGA 4 software [22] using the Neighbor-Joining (NJ) method and maximum composite likelihood or number of differences as models of distance.

## **2.7 Nucleotide sequence accession numbers**

The nucleotide sequences of Araruama I and Araruama II have been deposited in GenBank under accession numbers GU117706.1 and GU117707.1, respectively.

### 3. Results and discussion

This work intended to characterize and distinguish filamentous sulfide-oxidizing bacteria found in the Araruama and Itaipu coastal lagoons of Rio de Janeiro State. Until now, it was not evident whether there are ultrastructural differences between narrow and large *Beggiatoa*. With light and electron microscopy, we characterized and distinguished two types of trichomes, vacuolated and non-vacuolated. Furthermore, we confirmed by phylogenetic analysis that these bacteria belong to the genus *Beggiatoa*, supporting the use of morphological features as a tool for identifying these filamentous microorganisms. Bacteria were morphologically identified as belonging to the genus *Beggiatoa* if their cells were arranged in multicellular filaments, contained sulfur globules and were motile by gliding.

#### 3.1 Trichomes size distribution and motility

Light microscopy showed that all trichomes contained sulfur inclusions. Two types of trichomes (narrow and large) were discriminated in our measurements (Figures 1A, B). The mean diameter of narrow filaments was 4.4  $\mu\text{m}$  (standard deviation = 1.1; range = 2.4 to 6.5  $\mu\text{m}$ , n = 799) and large trichomes were about 13.5  $\mu\text{m}$  in diameter (standard deviation = 8.2; range = 6.5 to 34; n = 3094) whereas their lengths varied from 10  $\mu\text{m}$  to more than 30 mm. There are clearly three populations (Figure 1D), one formed by narrow trichomes from 2.4 to 6.5  $\mu\text{m}$ , another by large trichomes from 6.5 to 12.3  $\mu\text{m}$ , which seems to be the most abundant, and the third, formed by the largest filaments. At Itaipu Lagoon, we observed only filaments larger than 6.4  $\mu\text{m}$ , characterizing a population formed by vacuolated trichomes. Non-vacuolated trichomes were not detected at Itaipu Lagoon probably because of the physiological state of the bacteria and the sampling depth. Previous reports [4] showed that nitrate storing vacuolated



trichomes are localized close to the oxidized zone (upper layers of the sediment) where they can reload their vacuoles with nitrate, and narrow, non-vacuolated trichomes are located at suboxic zones, in deeper sediment layers [1]. The sediment from Itaipu Lagoon is harder than Araruama, which allowed us to sample only the upper sediment surface, where most trichomes were vacuolated. We observed varying numbers of cytoplasmic vacuoles in the large trichomes ranging from one (large) to many per cell. The length of the cells ranged from 4.8 to 13.2  $\mu\text{m}$  (mean cell length = 9.57  $\mu\text{m}$ ; standard deviation = 2.94).

Narrow trichomes glided with a mean speed of about 3.0  $\mu\text{m/s}$  ( $n = 20$ ), and large trichomes moved at approximately 1.5  $\mu\text{m/s}$  ( $n = 15$ ). Our results are in agreement with data previously reported [10,12,15]. We observed structures similar to the molecular motors described for some gliding cyanobacteria [23], where fibrillar longitudinal structures and a complex trans-peptidoglycan channel seem to be responsible for gliding motility. In this work, TEM showed some fibrillar structures at the surface of the trichomes (Figure 2A), consistent with the data obtained in previous studies [9]. Additionally, we can observe the mucus at the surface of an ultra-thin sectioned filament (Figure 2B).

### **3.2 Cell envelope**

Ultra-thin sections of narrow and large trichomes showed that the septa between individual cells are formed by cytoplasmic membrane, about 3.1 nm thick, plus the inner layer (named here “A” for narrow or “W” for large), which is about 3.5 nm thick (Figure 2E). The complex multilayered cell envelope structure, which is characteristic of *Beggiatoa* sp., is shown in figures 2C and 2D. Figure 2C shows that the cell envelope of narrow filaments consisted of five layers (from inside to outside,  $A = 2$  nm,  $B = 2$  nm,  $C = 3.4$  nm,  $D = 3.3$  nm,  $E = 3.6$  nm), as described for freshwater *B. alba* B15LD [9].

The differences of layer thickness between narrow trichomes and *B. alba* (the envelope of which is composed of five layers with two trilaminar structures, each 10 – 12 nm wide, layers *b* and *d*; [9]) may be due to the techniques employed. The ultrastructure of the *B. alba* cell envelope was studied using osmium/ruthenium-red cytochemistry, which could cause some difference in the thickness of membranes or other kinds of envelopes due to heavy metal precipitation during the staining procedure. Our analysis used a freeze-substitution technique without osmium tetroxide post-fixation, probably avoiding any kind of bulk precipitation. The cell envelopes observed in samples of large trichomes consisted of four layers. The first layer forms the septum whereas the other 3 layers surrounds the trichome in large filaments (total layers *W*, *X*, *Y* and *Z*, respectively, from inside to outside – Figure 2D), where the most external layer “*Z*” is the thicker one, with a mean width of 11.5 nm. The four-layered vacuolated and five-layered non-vacuolated envelopes could be related to the interaction of these microorganisms with its micro-environmental conditions. The surface structure of many uncultured microorganisms is more complex than the unusual gram-negative (3 layers) or gram-positive (2 layers) bacterial cell surface structure (REF). The presence of a more complex structure is considered as a response of the cell to the harsh environmental conditions usually found in aquatic environments (REF). Also, an uncultured bacterium with complex cell structure usually loses its complex surface structure when cultivated. It would be interesting to cultivate these microorganisms to study its physiology and structural response to cultivation.

### **3.3 Intracytoplasmic granules**

Confocal laser scanning microscopy of fixed large trichomes stained with the lipophilic dye FM<sup>®</sup> 1-43 showed septa between individual cells (Figure 3). Pasteris et al. [24] used epi-illumination reflection observation in confocal microscopy to

determine the 3-D spatial distribution of highly refractile sulfur precipitates in intact microorganisms with a spatial resolution of  $\leq 0.5 \mu\text{m}$ . We observed sulfur globules in all trichomes (Figures 3A-D) and, by analyzing the laser scanning microscopy series (not shown), it was possible to note that the sulfur inclusions are localized to the periphery of the trichomes, probably in the periplasmic space, as previously described for narrow freshwater *Beggiatoa* [25] and confirmed, in this study, by transmission electron microscopy.

The large vacuoles observed in CLS microscopy of large trichomes (Figure 3C) are thought to be nitrate vacuoles, although we could not determine the nitrate content in the cells because of the relatively small amount of material to do any biochemical analysis. CLS microscopy using FM® 1-43, which is a lipophilic fluorescent dye, showed that there is at least a lipid-rich layer outlining these structures in vacuolated trichomes. However, we could not detect a typical membrane surrounding the intracytoplasmic vacuoles by transmission electron microscopy, probably because this structure does not consist of a typical trilaminar membrane profile. In a previous study [10] using ultra-thin section transmission electron microscopy to characterize a large vacuolated *Beggiatoa* sp. [10], no membrane was also observed enveloping the intracytoplasmic vacuoles.

But it is known that there are four types of inclusions reported for various *Beggiatoa* strains: PHB (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) [9], polyphosphate [25], sulfur [9] and nitrate [26] inclusions. Large nitrate vacuoles have been described as a property general to these large *Beggiatoa* filaments [10,27]. All conspicuous cytoplasmic vacuoles occurring in large marine filamentous sulfur bacteria are described as nitrate vacuoles, except for vacuoles of attached sulfide-oxidizing bacteria (VAF – vacuolated attached filament) found on shallow hydrothermal vents [28], which are not involved in

respiratory nitrate accumulation. Additionally, phylogenetic reconstructions based on 16S rRNA shown that VAF is representative of attached members of the clade of vacuolated bacteria that does not belong to the genera *Beggiatoa* or *Thioploca* [29]. Scanning electron microscopy of fractured trichomes showed that the trichome structure consists of cytoplasm, different globules, and the septa between the individual cells (Figure 3E).

Transmission electron microscopy of samples prepared for routine and cytochemistry methods showed differences in the complex ultrastructure of trichomes. TEM micrographs from narrow trichomes processed by freeze-substitution (Figure 3F) showed an electron-dense inclusion that is probably the phosphorous-rich inclusion detected by X-ray microanalysis (Figure 4A, B). Although the staining technique used to recognize polyphosphate bodies was considered to be nonspecific [30], in this study we show, by X-ray microanalysis, that narrow trichomes contain phosphorous-rich bodies (Figure 4A, B). Itaipu and Araruama lagoons environments are impacted by domestic sewage (Itaipu Lagoon) and also secondary wastewater treatment (Araruama Lagoon). Both lagoons are hypertrophic as a result of increasing nitrogen and phosphorous concentrations caused by the input of residual waters. The increase of up to 10 times in phosphorous and chlorophyll concentrations along 20 years in Araruama Lagoon indicates that eutrophication is chronic, with an internal unbalanced cycling of nutrients [32]. Seufferheld et al. [33] showed that polyphosphate is involved in a wide range of regulatory systems in bacterial genomics, directly influencing the metabolic state of the bacterial cell, especially at high salt concentrations. Thus, the storage of phosphorus in P-rich inclusions on the trichomes may reflect the metabolic state of the cell, most likely related to the unbalanced availability of nutrients in Itaipu and Araruama environments.

Also in both routine and imidazole-buffered post-fixation preparations, we observed that sulfur inclusions are enveloped by a thin electron-dense monolayered envelope, located within the invagination of the cytoplasmic membrane and closely associated with it (Figures 3G, H). Calcium chloride was added in the buffer during fixation and post-fixation procedures to improve ultrastructural preservation and to avoid artifacts produced by dislocation of calcium from various cellular structures (Figure 3I) and showed high numbers of round particles with a radially arranged filling. These granules bear no similarity to sulfur or polyphosphate inclusions of bacteria. X-ray microanalysis confirmed that both bacteria contain sulfur inclusions (Figure 4A, C, D, E); the other detected elements come from the cytoplasm and/or salt crystals from the marine/hypersaline water. The high copper peaks observed in the spectra are an artifact generated by the copper grids used in the analyses.

Sulfur globules are observed in thin sections as non-unit membrane-enclosed electron lucent structures because sulfur is removed during dehydration and commonly deposited in invaginated pockets of the cytoplasmic membrane, inside the cell wall but outside the cytoplasmic membrane. Strohl et al. [31] concluded that the size and amount of these inclusions depends on the metabolic stage and reported that sulfur inclusion envelopes consisted of a single electron-dense layer, 4-5 nm thick, in narrow freshwater *B. alba* strains L1401-13, B25RD and B18LD, when a modified Ryter-Kellerberger and ruthenium-red glutaraldehyde fixation protocol were used. We found a sulfur inclusion envelope with a mean thickness of 17.4 nm in imidazole-buffered cytochemistry. The thickness difference may be because these two types of *Beggiatoa* probably belong to distinct species and/or because the environments from which the microorganisms were isolated are quite different. On the other hand, many different inclusions were described for freshwater and marine strains [29], and the cytochemistry used in each study [31,

this study] had different objectives: Ryter-Kellerberger and ruthenium-red are used to reveal acidic carbohydrates, whereas imidazole cytochemistry is used to show lipid inclusions.

The diameters of the trichomes in addition to the distinctiveness of the environment in which they occur separate these microorganisms from previously described ones. As far as we know, this is the first report based on morphological characteristics of vacuolated filamentous sulfur bacteria from *Beggiatoa* genus. The morphological features observed in large *Beggiatoa* from Rio de Janeiro are similar, but not identical, to the ultrastructural features described in other *Beggiatoa* (Figure 5) [9,31,35]. Two main groups, clusters A and B, were formed by marine and freshwater *Beggiatoa*, respectively. As we can observe, based on morphology already described, *Beggiatoa* from the Araruama and Itaipu lagoons differ from the others. The large Itaipu specimens were grouped in cluster C with *Beggiatoa* from Guaymas Basin [10]. Nelson, Wirsen and Jannash observed ultrathin sections from a vacuolated *Beggiatoa*, but they did not explore the differences between both types of these filamentous bacteria. No multilayered cell wall, similar to that described for *Thioploca* [36], or membrane surrounding the liquid vacuole from the cytoplasm was observed. Ultrastructural features are described only for freshwater *Beggiatoa*, which clustered together (cluster B). Filamentous sulfide-oxidizing bacteria found at Araruama (cluster D) and Itaipu Lagoons (cluster C) grouped near but separated from each other, according to the presence or absence of nitrate vacuoles and the environment in which they were found. These analyses confirm the there are morphological and ultrastructural differences between narrow and large *Beggiatoa*.

### **3.4 Phylogenetic analysis**

The phylogenetic tree obtained from RDP SeqMatch hits clearly shows two distinct groups, A and B, one of them formed only by filamentous sulfide-oxidizing bacteria and the other by a variety of marine bacteria (Figure 6). Cluster B, formed by filamentous sulfide-oxidizing bacteria, contains *Beggiatoa* trichomes and three other vacuolated filamentous bacteria found in marine environments, which do not belong to this genus. The sequences obtained in this work (Araruama *Beggiatoa* I and II) grouped with MS-81-6, a non-vacuolated isolate from a marine environment with a mean diameter of 4-5  $\mu\text{m}$ . The other narrow marine *Beggiatoa* strain, MS-81-1c, formed a distinct branch, as previously observed by Ahmad, Kalanetra and Nelson [7]. The sequence belonging to Chiprana Lake *Beggiatoa* clustered with vacuolated trichomes, in contrast to the findings of Hinck et al. [12] that vacuolated *Beggiatoa* samples obtained clustered with narrow marine *Beggiatoa*. This may be due to the addition of new sequences or the different methods of distance employed in the two phylogenetic analyses; however, Araruama I and II still clustered with narrow marine *Beggiatoa*.

The analysis of the first 40 hits obtained with BLAST-N software yielded a similar topology to the analysis performed with only reference sequences from the RDP database (Figure 7). The phylogenetic tree obtained showed two consistent groups (C and D), where group D mainly comprised different sequences belonging to the marine *Gammaproteobacteria* group. Araruama sequences were clustered in group D along with other sequences belonging to narrow marine *Beggiatoa*. Once again, the Lake Chiprana sequence was clustered with large vacuolated *Beggiatoa*. Even though vacuolation and nitrate storage features are not found exclusively in specimens with the highest diameters, all trichomes that possess these characteristics clustered at the same branch of the phylogenetic tree based on *rrs* gene analysis. Thus, not only environment,

but also nitrate storage and the ability to reach high diameters appear to be in agreement with the clustering of the strains.

A phylogenetic tree constructed using only sequences from filamentous gliding sulfide-oxidizing bacteria corroborated the other analyses (Figure 8). The tree topology showed the presence of two main clusters: cluster I, formed only by marine sequences and cluster II, formed only by freshwater sequences. All vacuolated trichomes remained together in the marine cluster composed of filaments from the genus *Beggiatoa* and from VAF (both from White Point and Escanaba Trough). A subgroup (cluster III) appears in the marine cluster, formed by narrow Araruama I and II and MS-81-6. Except for the Lake Chiprana sequences, all sequences in this subgroup are from non-vacuolated strains.

The Araruama sequences did not cluster together because MS-81-6 is closer to Araruama I than to Araruama II (97% versus 96% identity). Thus, MS-81-6 always clustered with Araruama I, and Araruama II remained in a different group. The small differences between Araruama 16S rRNA clones may suggest that both sequences belong to the same species that they represent two subspecies or even two copies of the *rrs* gene present in the genome of the same population. Although the *rrs* gene has been widely used, mostly because there are a high number of deposited sequences for this gene, it has a low resolution power at the species level for certain bacterial groups [37, 38, 39], that cannot be separated by these methodology. However, ribosomal gene sequence analysis is a good method for initial identification of new or poorly classified bacteria, leading to the recommendation for ribosomal gene sequence inclusion in new species descriptions or initial phylogenetic affiliations.

### **3.5 Conclusions**



The size of the trichomes is used to discriminate between narrow (vacuole absent) and large (vacuole present) *Beggiatoa* [7]. However, our data indicate that the only criterion that seems to distinctively separate *Beggiatoa* is the presence/absence of the intracytoplasmic vacuole because we observed both vacuolated and non-vacuolated narrow filaments in the Araruama Lagoon, and only vacuolated trichomes in Itaipu Lagoon. The ultrastructural differences observed between filamentous bacteria from Brazilian coastal lagoons and the previously described freshwater *B. alba* may be because of the difference in the width, environment or the species to which they belong. The differences in envelope structure showed in this manuscript, where five-layered envelope is related to non-vacuolated trichomes, and four-layered to vacuolated ones, could reflect the phylogenetic distance between these two types of filaments, since non-vacuolated trichomes from Araruama Lagoon clustered with narrow, non-vacuolated, freshwater *B. alba*, which is phylogenetically distant from vacuolated filaments. Our data on morphological features observed in filamentous sulfide-oxidizing bacteria from Rio de Janeiro and phylogenetic analyses suggest that the trichomes belong to the genus *Beggiatoa*. Moreover, we showed, for the first time, the differences in ultrastructure between narrow and large *Beggiatoa*, enhancing our understanding of the taxonomy of this genus, based on environmental sequences, with a finer ultrastructural analysis.

### **Acknowledgements**

We thank Dr. FF Mota (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) for helping with the phylogenetic analyses. Financial support was provided by the CNPq, CAPES and FAPERJ Brazilian programs.

## 5. References

- [1] L.A. Robertson, J.G. Kuenen, The colorless sulfur bacteria, in: M. Dworkin, S. Falcow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer, E. Stakebrandt (Eds.), *The prokaryotes*, Springer-Verlag, New York, 2006, vol. 2, pp. 985-1011.
- [2] B.B. Jørgensen, D.J. Des Marais, Competition for sulfide among colorless and purple sulfur in cyanobacterial mats, *FEMS Microbiol. Ecol.* 38 (1986) 179-186.
- [3] H. Kojima, M. Fukui, Phylogenetic analysis of *Beggiatoa* spp. from organic rich sediment of Tokio Bay, Japan, *Water Res.* 37 (2003) 3216-3223.
- [4] A. Preisler, D. De Beer, A. Lichtschlag, G. Lavik, A. Boetius, B.B. Jørgensen, Biological and chemical sulfide oxidation in a *Beggiatoa* inhabited marine sediment, *ISME J.* 1 (2007) 341-353.
- [5] J.L. Macalady, D. Sharmishtha, I. Schaperdoth, D.S. Jones, G.K. Druschel, D. Eastman, Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters, *ISME J.* 2 (2008) 590-601.
- [6] J.S. Otte, L.G. Kuenen, L.P. Nielsen, H.W. Paerl, J. Zopfi, H.N. Schulz, A. Teske, B. Strotmann, V.A. Gallardo, B.B. Jørgensen, Nitrogen, carbon, and sulfur metabolism in natural *Thioploca* samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3148-3157.
- [7] A. Ahmad, K.M. Kalanetra, D.C. Nelson, Cultivated *Beggiatoa* spp. define phylogenetic root of morphologically diverse, noncultured, vacuolated sulfur bacteria, *Can. J. Microbiol.* 52 (2006) 591-598.
- [8] W.R. Strohl, Genus 1. *Beggiatoa*, in: R.E. Buchanan RE, N.E. Gibbons NE (Eds.), *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1989, pp. 2091- 2097.

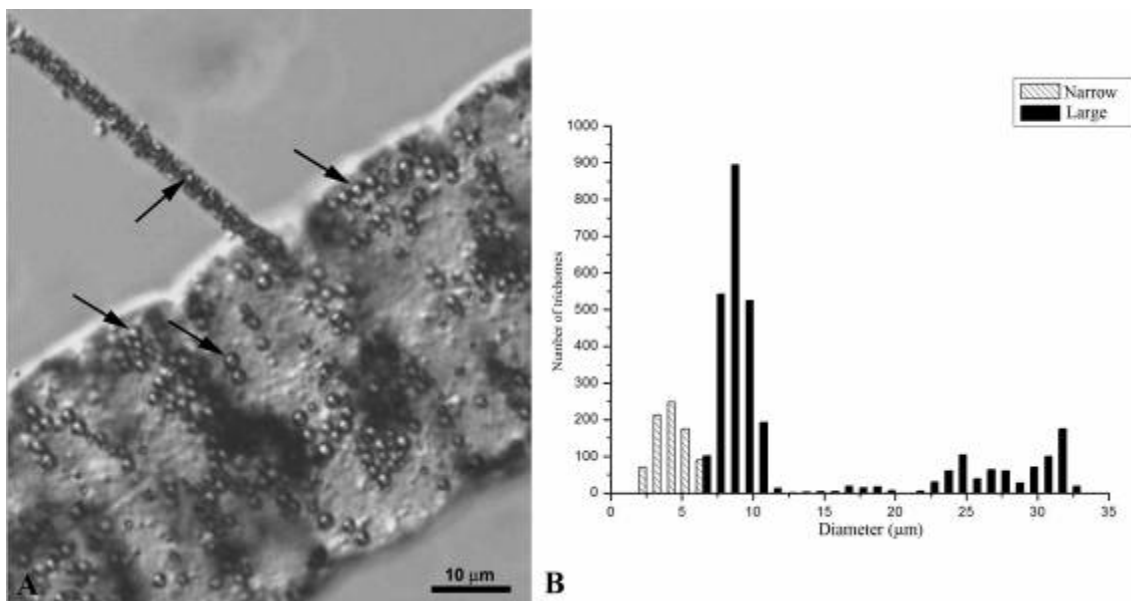
- [9] W.R. Strohl, K.S. Howard, J.M. Larkin, Ultrastructure of *Beggiatoa alba* strain B15LD, J. Gen. Microbiol. 128 (1982) 73-84.
- [10] D.C. Nelson, C.O. Wirsen, H.W. Jannasch, Characterization of large, autotrophic *Beggiatoa* spp. abundant at hydrothermal vents of the Guaymas Basin, Appl. Environ. Microbiol. 55 (1989) 2909-2917.
- [11] J.M. Larkin, W.R. Strohl, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, and *Thioploca*, Annu. Rev. Microbiol. 37 (1983) 341-367.
- [12] S. Hinck, T.R. Neu, G. Lavik, M. Mußmann, D. De Beer, H.M. Jonkers, Physiological adaptation of nitrate storing *Beggiatoa* to diel cycling in a phototrophic hypersaline mat, Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007) 7013-7022.
- [13] B. Kjerfve, C.A.F. Schettini, B. Knoppers, G. Lessa, H.O. Ferreira, Hydrology and salt balance in a large, hypersaline coastal lagoon: Lagoa de Araruama, Brazil, Est. Coast Shelf Sci. 42 (1996) 701-725.
- [14] P.C. Kuchler, A.S. Ferreira, J.A. Silva, A.T. Silva, A análise da diminuição do espelho d'água das Lagoas de Itaipu e Piratininga com o subsídio do sensoriamento remoto, in: Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, INPE, Brasil, 2005, pp. 3651-3653.
- [15] A. Kamp, H. Røy, H.N. Schulz-Vogt, Video-supported analysis of *Beggiatoa* filament growth, breakage, and movement, Microb. Ecol. 56 (2008) 484-491.
- [16] J.J. Bozola, L.D. Russel, Speciment preparation for scanning electron microscopy, in: Electron microscopy: principles and techniques for biologists, Jones and Bartlett Publishers (Eds.), Boston, 1992, pp. 50-71.

- [17] S. Angermüller, H.D. Fahimi, Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy, *Histochem. J.* 14 (1982) 823-835.
- [18] J.L. Oschman, B.J. Wall, Calcium binding to intestinal membranes, *J. Cell Biol.* 55 (1972) 58-67.
- [19] M.S. Forbes, B.A. Plantholt, N. Sperlakis, Cytochemical staining procedures selective for sarcotubular systems of muscle: modifications and applications, *J. Ultrastruct. Res.* 60 (1977) 306-27.
- [20] P.A. Édén, T.M. Schmidt, R.P. Blakemore, N.R. Pace, Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1991) 324-325.
- [21] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucl. Acids Res.* 24 (1997) 4876-4882.
- [22] K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Mol. Biol. Evol.* 24 (2007) 1596-1599.
- [23] E. Hoiczky, W. Baumeister, Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 2387-2395.
- [24] J.D. Pasteris, J.J. Freeman, S.K. Goffredi, K.R. Buck, Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria, *Chem. Geol.* 180 (2001) 3-18.

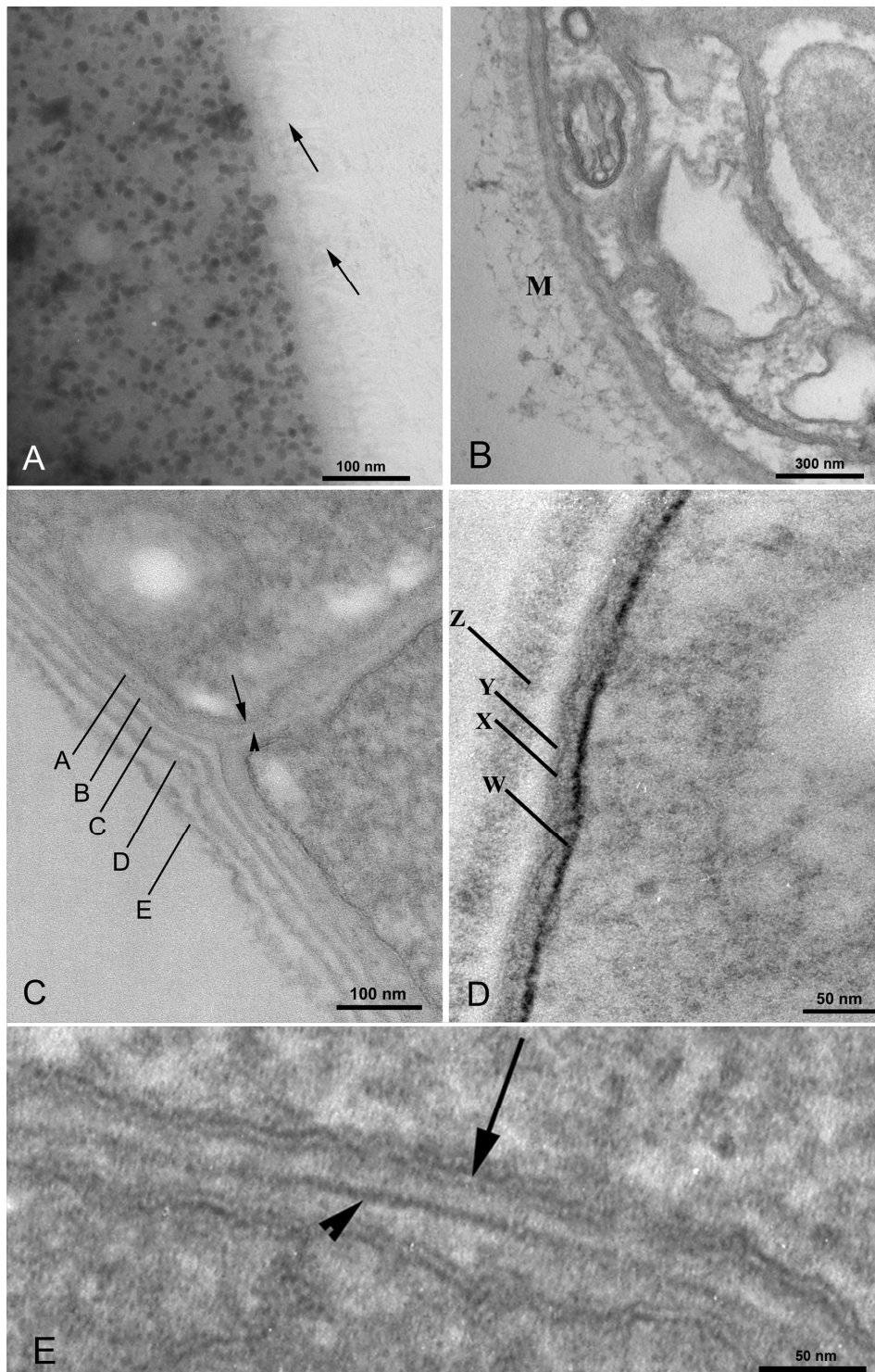
- [25] W.R. Strohl, J.M. Larkin, Enumeration, isolation and characterization of *Beggiatoa* from freshwater sediments, *Appl. Environ. Microbiol.* 36 (1978) 755-770.
- [26] S.C. Mc Hatton, J.P. Barry, H.W. Jannasch, D.C. Nelson, High nitrate concentrations in vacuolate, autotrophic marine *Beggiatoa* spp, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 954-958.
- [27] M. Mussman, H.N. Schulz, B. Strotmann, T. Kjaer, L.P. Nielsen, R.A. Rossello-Mora, R.I. Amann, B.B. Jørgensen, Phylogeny and distribution of nitrate- storing *Beggiatoa* spp. in coastal marine sediments. , *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 523-533.
- [28] K.M. Kalanetra, S.L. Huston, D.C. Nelson, Novel, attached, sulfur-oxidizing bacteria at shallow hydrothermal vents posses vacuoles not involved in respiratory nitrate accumulation, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 7487-7496.
- [29] A.Teske, D.C. Nelson, The genera *Beggiatoa* and *Thioploca*, in: M. Dworkin, S. Falcow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer, E. Stackebrandt, (Eds.), *The prokaryotes*, Springer-Verlag, New York, 2006, pp. 784-810.
- [30] N.R. Krieg, P.B. Hylarmon, The taxonomy of the chemoheterotrophic spirilla, *Ann. Rev. Microbiol.* 30 (1976) 303-325.
- [31] W.R. Strohl, I. Geffers, J.M. Larkin, Structure of the sulfur inclusion envelopes from four *Beggiatoas*, *Curr. Microbiol.* 6 (1981) 76-79.
- [32] A.L.S. Moreira, A Eutrofização na Lagoa de Araruama e o Impacto Ambiental das Estações de Tratamento Secundário,  
<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agua/salgada/index.html&conteudo=./agua/salgada/artigos/araruama.html>. Access date: December 21st, 2009.

- [33] M.J. Seufferheld, H.M. Alvarez, M.E. Farias, Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 5867-5874.
- [34] C.D. Fraley, M.H. Rashid, S.S.K. Lee, R. Gottschalk, J. Harrison, P.J. Wood, M.R.W. Brown, A. Kornberg, A polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 3526–3531.
- [35] R.Y. Morita, P.W. Stave, Electron micrograph of an ultrathin section of *Beggiatoa*, *J. Bacteriol.* 85 (1963) 940-942.
- [36] S. Maier, V.A. Gallardo, *Thioploca araucae* sp. nov. and *Thioploca chilae* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34 (1984) 414-418.
- [37] U. Nübel, B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R.I. Amann, W. Ludwig, H. Backhaus, Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 5636-5643.
- [38] S. Niemann, D. Harmsen, S.R. Sch-Gerdes, E. Richter, Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 3231-3234.
- [39] R. Fronthingham, H.G. Hills, K.H. Wilson, Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 1639-1643.

## Figure Legends



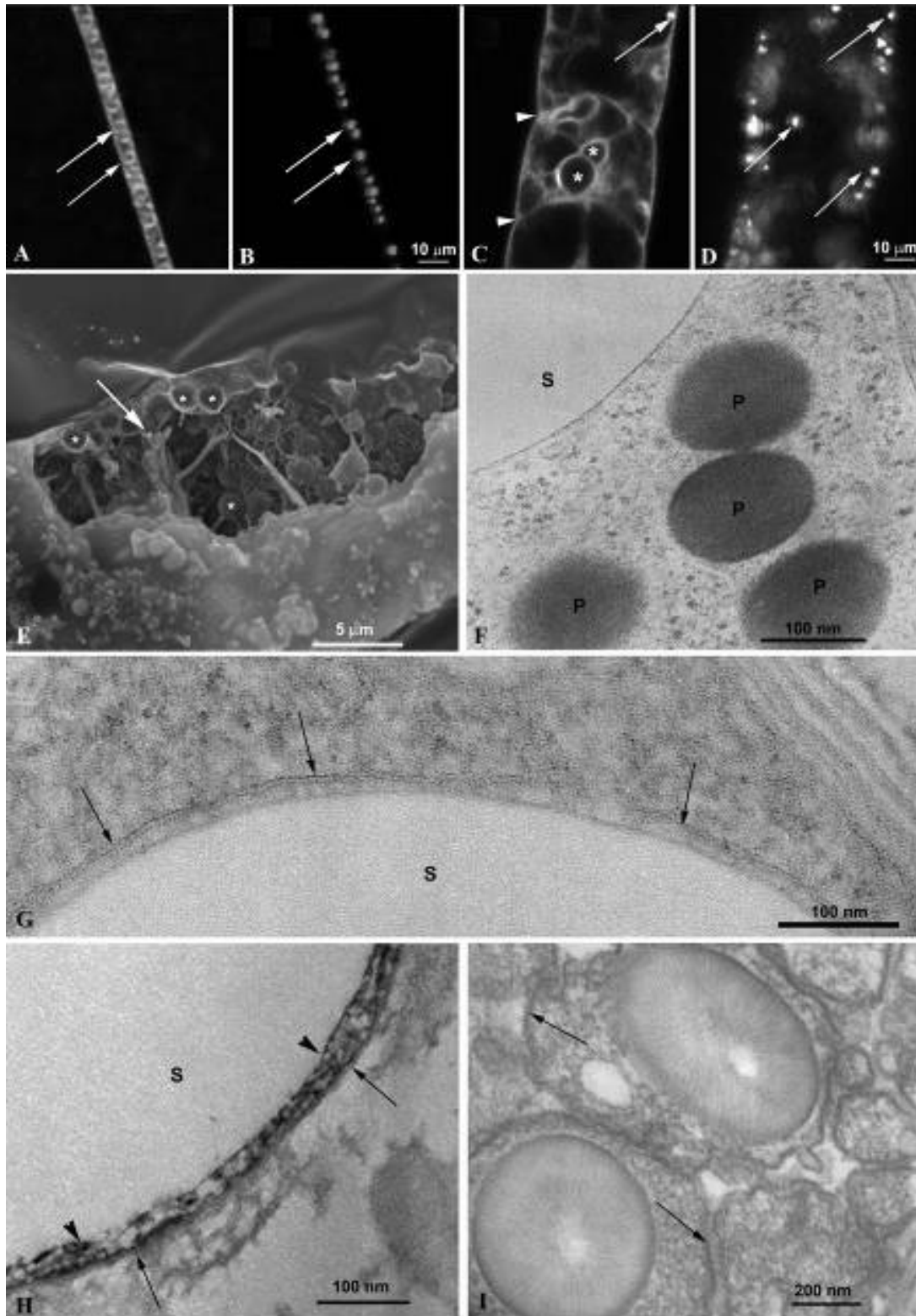
**Figure 1: Distribution of *Beggiatoa* sp. filament diameters in the Araruama and Itaipu Lagoons.** (A) Nomarski differential interference contrast light micrograph showing both narrow and large trichomes from the Araruama Lagoon. The arrows point to sulfur granules. (B) Histogram showing the frequency of filament widths found at the sample sites.



**Figure 2: Transmission electron micrographs of the cell surface structures of *Beggiatoa* filaments** (A) Negative staining showing fibrillar structures at the filament surface (arrows); (B) Calcium chloride cytochemistry with post-fixation by osmium tetroxide-potassium ferrocyanide, showing a thick mucilaginous layer (M) at the filament surface. (C) TEM of “en bloc” uranyl acetate procedure showing the five-

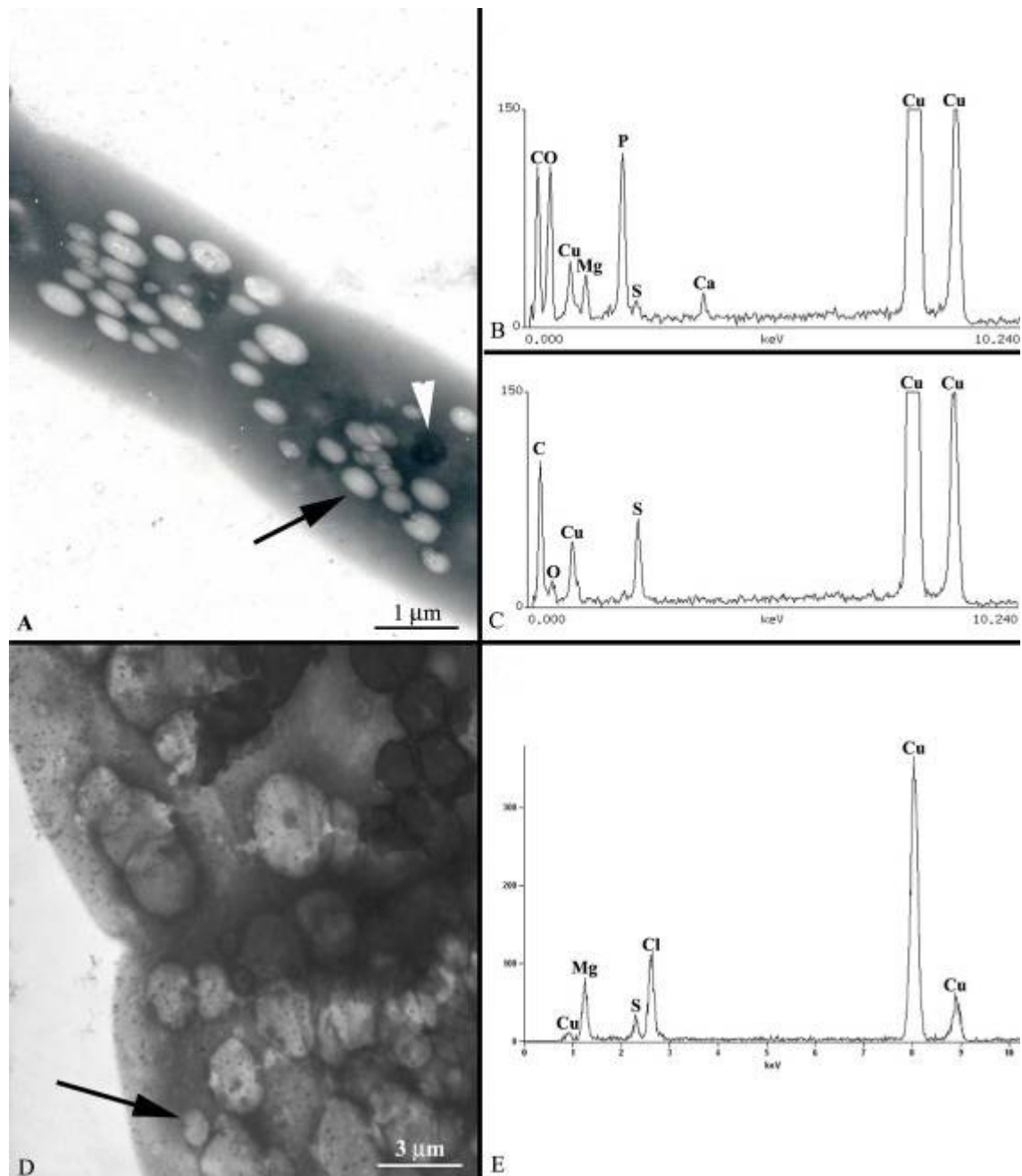


layered envelope (*A, B, C, D, E*) and the septum. The arrowhead points to the inner layer of the cell envelope, and the arrow points to the cytoplasmic membrane. (D) Freeze-substitution showing the complex multilayered envelope of a large *Beggiatoa* (*X, Y, W, Z*). (E) Septum of a routinely-processed trichome, formed by the first envelope layer “A” or “W” (arrowhead) plus the cytoplasmic membrane (arrow).

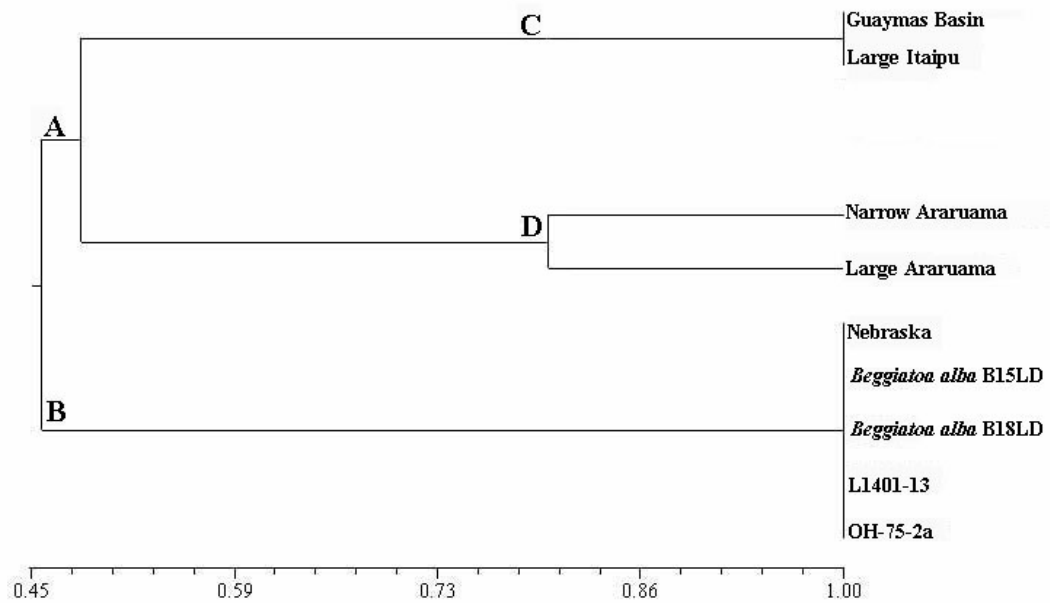


**Figure 3: Intracytoplasmic granules of *Beggiatoa* sp.** (A-D) Confocal laser scanning micrographs of the middle portion of a narrow (A, B) and a large trichome (C, D) showing the sulfur inclusions in both trichomes (arrow), and the septa (arrowhead) and

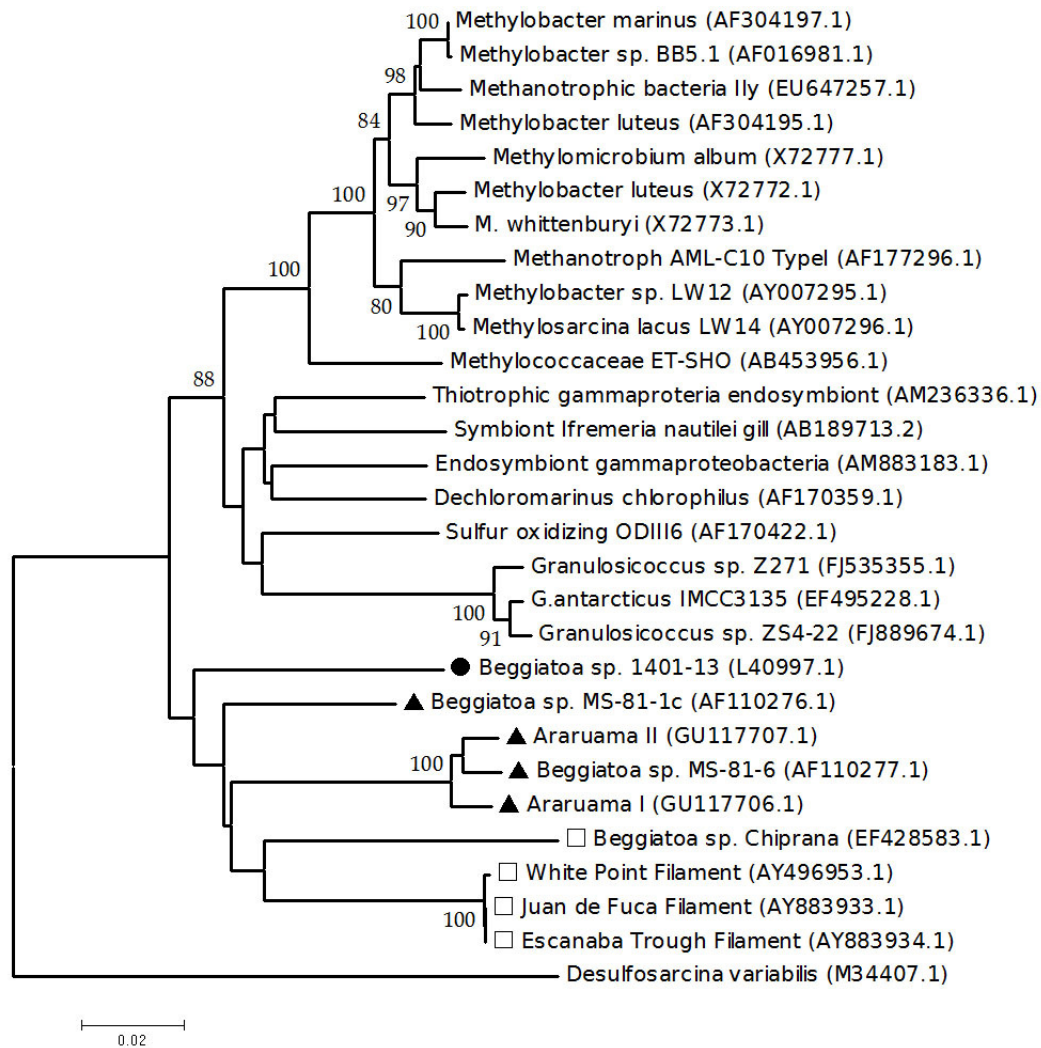
vacuoles (asterisks) in the large filament (C-D). The fluorescence of the lipophilic dye FM1-43 shows the membrane outlines (A, C), whereas the epireflection (B, D) confirmed the sulfur component of the peripheral globules. (E) Scanning electron micrograph of a dry-fractured large trichome, where several spherical structures that probably correspond to sulfur globules (asterisks) and also a septum (arrow) can be observed. (F) Freeze-substituted TEM of a narrow filament, where electron-dense cytoplasmic inclusions, probably phosphorous-rich bodies (P), are shown. A sulfur globule is also observed. (G-H) Sulfur inclusions (S) and their relation to the cytoplasmic membrane (arrows) in a routinely processed narrow trichome and imidazole-buffered post-fixed large trichome, respectively. (I) Extracytoplasmic inclusion with radial fine structure observed in a large trichome processed with the addition of calcium chloride in buffer solutions during fixation and post-fixation procedures.



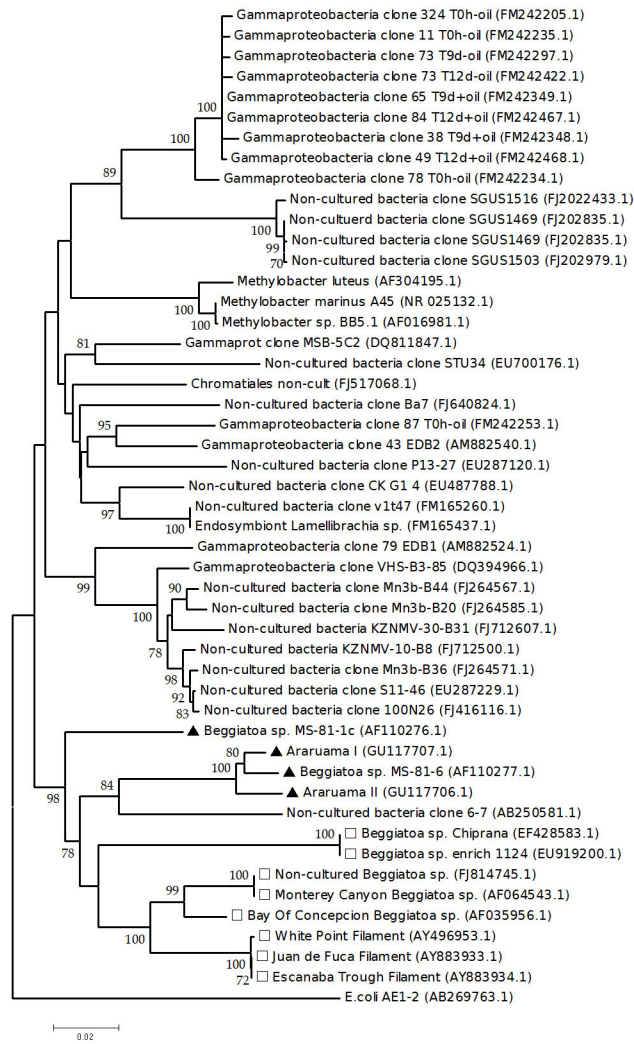
**Figure 4: Transmission electron micrographs and energy-dispersive X-ray microanalysis of *Beggiatoa*.** (A) TEM of a narrow trichome, showing electron-dense phosphorous rich inclusions (arrowhead) and electron-lucent sulfur inclusions (arrow). (B, C) Energy-dispersive X-ray spectra of a polyphosphate granule (B) and a sulfur inclusion (C) found in a narrow filament. (D) TEM of a large trichome, showing an electron-lucent inclusion (arrow). (E) X-ray microanalysis spectrum of an electron-lucent inclusion, confirming the presence of a sulfur globule. The copper grids come from the grid bars.



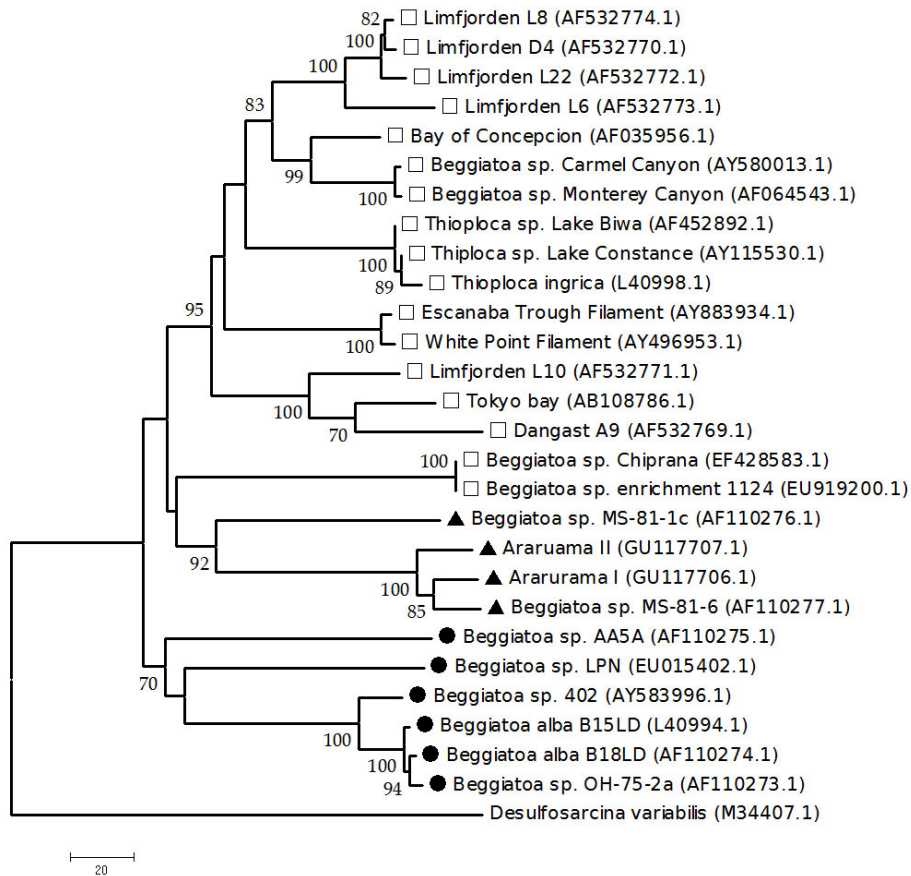
**Figure 5: Cladogram constructed according to morphologic and environmental features of large and narrow *Beggiatoa*.** UPGMA analysis using the DICE coefficient of similarity based on morphologic features of narrow and large *Beggiatoa* from Araruama and Itaipu Lagoons, compared to others previously described. (A) Marine/hypersaline *Beggiatoa*, (B) Freshwater *Beggiatoa*, (C) Marine *Beggiatoa* and (D) Hypersaline *Beggiatoa*.



**Figure 6:** Phylogenetic tree of full *rrs* gene sequences (1500 bp) showing the relationship of the Araruama narrow trichomes and the sequences from RDP database (SeqMatch). This tree was constructed by neighbor-joining and number of differences as model of distance. Bootstrap results >50% are represented at the branch points. (A) Marine *Gammaproteobacteria*; (B) Filamentous sulfide-oxidizing bacteria (▲ Marine narrow *Beggiatoa*, □ Marine large sulfide-oxidizing bacteria, ● Freshwater *Beggiatoa*).



**Figure 7:** Phylogenetic tree of full *rrs* gene sequences (1500 bp) showing the relationship of the Araruama narrow trichomes and the first 40 hits obtained from the alignment with sequences from the NCBI GenBank database. This tree was constructed by neighbor-joining using the number of differences as the model of distance. Bootstrap results >50% are represented at the branch. (A) Marine *Gammaproteobacteria*; (B) Filamentous sulfide-oxidizing bacteria (▲ Marine narrow *Beggiatoa*, □ Marine large sulfide-oxidizing bacteria).



**Figure 8:** Phylogenetic tree of full *rrs* gene sequences (1500 bp) showing the relationship of the Araruama narrow trichomes and sequences of filament gliding sulfide oxidizing bacteria from the NCBI GenBank database. This tree was constructed by neighbor-joining with maximum composite likelihood as the model of distance. Bootstrap results >50% are represented at the branch points. (I) Filamentous sulfide-oxidizing bacteria, (II) Freshwater narrow *Beggiatoa*, (III) Marine/hypersaline narrow *Beggiatoa*. (□ Large/vacuolated marine sulfide-oxidizing bacteria, ▲ Narrow/non-vacuolated marine *Beggiatoa*, ● Freshwater *Beggiatoa*).



# 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](#)