

Fernanda de Ávila Abreu

BACTÉRIAS MAGNETOTÁTICAS ENCONTRADAS EM AMBIENTES EXTREMOS



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

Orientador: Dr. Ulysses Garcia Casado Lins



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

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Abreu, Fernanda de Ávila
Bactérias magnetotáticas encontradas em ambientes extremos/ Fernanda
de Ávila Abreu –
Rio de Janeiro 2010
XII, 107
Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)]
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof.
Paulo
de Góes, 2010

Orientador: Ulysses Garcia Casado Lins

Referências bibliográficas:f 101

1.ambientes extremos 2. diversidade 3. bactérias magnetotáticas 4.
procariotos multicelulares magnetotáticos 5. morfologia 6. ultraestrutura I.
Lins Ulysses. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes,
Doutorado em Ciências (Microbiologia).

III. Bactérias magnetotáticas encontradas em ambientes extremos

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 e no laboratório do Prof. Dennis Bazylnski, School of Life Sciences, University of Nevada, Las Vegas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e amigos, especialmente à minha mãe, Analucia, minhas irmãs, Ana Paula e Luciana, e ao Bernardo por entender meus atrasos diários e minha ausência por alguns meses.

Aos amigos do laboratório ou que eram do laboratório, especialmente Júlia Albuquerque, Thais Silveira, Iamê Guedes, Herval de Oliveira, Juliana Martins, Karen Silva e Fernando Almeida, obrigada por tudo.

Agradeço às amigas Leida Abraçado, que nunca desistiu de mim e continua me explicando Física, e Carolina Koeller pela paciência e ajuda.

Agradeço aos amigos Marian Schmidt, Paul Howse, Kelly Capola, Christopher Lefevre por animarem minha vida e ao Christopher especialmente por me ensinar a cultivar algumas bactérias magnetotáticas.

Ao laboratório de Biologia Celular Hertha Meyer pelo suporte em microscopia.

Agradeço aos Professores Marcos Farina, Thaís Souto-Padron, Lucy Seldin, Carolina Keim e Norton Heise pela ajuda durante esses quatro anos.

Agradeço especialmente aos Professores Alexandre Rosado e Vivian Pellizari pela oportunidade de trabalhar com amostras coletadas na Antártica.

Agradeço especialmente ao Prof. Ulysses Garcia Casado Lins e ao Prof. Dennis Bazylnski pelas oportunidades e por terem me ensinado muito.

À pós-graduação do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, na pessoa da Dra. Ana Paula Vieira Colombo.

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

Ao CNPq, PROANTAR, MCT, FAPERJ, CAPES, pelo financiamento.

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

RESUMO

Fernanda de Ávila Abreu

Bactérias magnetotáticas encontradas em ambientes extremos

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.

As bactérias magnetotáticas são capazes de responder a campos magnéticos devido à presença de nano-partículas ricas em ferro e envoltas por membrana em seu citoplasma, chamadas de magnetossomos. Os magnetossomos podem ser de óxido de ferro, magnetita (Fe_3O_4), ou sulfeto de ferro, greigita (Fe_3S_4). Os genes relacionados à formação do magnetossomo estão organizados em uma região genômica denominada ilha do magnetossomo, que pode ser transferida entre espécies por transferência lateral de genes. As bactérias magnetotáticas apresentam grande diversidade morfológica e não são todas relacionadas filogeneticamente. Dentre os morfotipos encontrados no grupo, a forma multicelular, denominado "*Ca. Magnetoglobus multicellularis*", se destaca por sua complexidade morfológica. Bactérias magnetotáticas têm sido encontradas em sedimento de ambientes aquáticos, colunas estratificadas de água e solos alagados. Todos esses ambientes possuem características não extremas com pH próximo ao neutro. Nessa tese pretendeu-se ampliar a gama de ambientes onde são encontradas bactérias magnetotáticas através de sua busca em ambientes extremos, estudando sua morfologia e filogenia e procurou-se aumentar a base de conhecimentos sobre "*Ca. M. multicellularis*" através do estudo das relações intercelulares e elementos intracelulares que possam estar envolvidos na morfogênese multicelular peculiar desse microrganismo. Os resultados obtidos mostram a presença de bactérias magnetotáticas em ambientes desérticos e polares e também em fontes termais. Dentre os novos representantes do grupo encontrados estão: BW-1, um bastonete

produtor de greigita pertencente à *Deltaproteobacteria*; BW-2, que é a primeira bactéria magnetotática descrita em *Gammaproteobacteria* e essa produz cristais de magnetita; HSMV-1, vibrião moderadamente termófilo que sintetiza cristais de magnetita; e três espécies diferentes de cocos magnetotáticos encontrado na costa da Antártica. O estudo ultraestrutural de “*Ca. M. multicellularis*” mostrou que a adesão celular é provavelmente feita por carboidratos na superfície celular do microrganismo e que a interação entre as células é essencial para a determinação de sua forma. Além disso, foi possível observar, com auxílio da reconstrução tridimensional a partir de cortes seriados, que a divisão celular ocorre simetricamente, e que o menor eixo da célula situa-se radialmente em relação ao microrganismo, diferentemente do proposto anteriormente. A reconstrução tridimensional ainda mostrou que as cadeias de magnetossomos de cada célula estão alinhadas em relação às outras células do microrganismo. Durante as coletas foi observada a presença microrganismos semelhantes à “*Ca. M. multicellularis*”, mas que não respondiam ao campo magnético. Análises filogenética e morfológica desses microrganismos mostraram grande semelhança com a espécie magnetotática, exceto pela ausência de magnetossomos, o que sugere a existência de uma ilha genômica do magnetossomo e a possível transferência lateral de genes para os genes relacionados à síntese de magnetossomos de sulfeto de ferro. As principais conclusões da tese são: bactérias magnetotáticas podem ser encontradas em ambientes extremos, podendo ser psicrófilas ou termófilas; a formação de magnetossomos de greigita também pode estar relacionada a genes encontrados em uma ilha genômica; a organização celular em “*Ca. M. multicellularis*” parece ser promovida por carboidratos na superfície das células e/ou de moléculas de adesão celular dependentes de cálcio, que parecem ter essencial função no ciclo de vida exclusivamente multicelular do microrganismo.

Palavras chave: ambientes extremos, diversidade, bactérias magnetotáticas, procariotos multicelulares magnetotáticos, morfologia e ultraestrutura.

ABSTRACT

Fernanda de Ávila Abreu

Magnetotactic bacteria from extreme environments

Advisor: Ulysses Garcia Casado Lins

Doctoral thesis abstract submitted to the Graduate Program in Science (Microbiology), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, as a requisite to obtain the Doctor degree in Biological Sciences.

Magnetotactic bacteria respond to magnetic fields because of the presence of intracellular iron-rich nano particles enveloped by a lipid bilayer called magnetosomes. The magnetosome magnetic crystals composition can be of iron oxide, magnetite, or iron sulfide, greigite. Genes related to magnetosome formation are organized in an instable genomic region called magnetosome island. It has been proposed that this region can be transferred between species by horizontal gene transfer. Magnetotactic bacteria are very diverse in morphology and are not phylogenetically related. The multicellular morphotype called "*Ca. Magnetoglobus multicellularis*" is considered the most interesting because of its structural complexity. Magnetotactic bacteria are found in the sediment of aquatic environments, stratified water columns and wet soils. All these environments are not extreme and have pH near neutral. Here, we describe magnetotactic bacteria in extreme environments. Their morphology and phylogeny were studied. We also studied intercellular interactions and intracellular elements that could be involved in the multicellular morphogenesis of "*Ca. M. multicellularis*". This would increase the available data about this peculiar microorganism that live in a hypersaline environment. Here we show that magnetotactic bacteria are found in desert and polar environments and hot springs. New magnetotactic bacteria are: BW-1, a greigite producer rod related to *Deltaproteobacteria*; BW-2 the first magnetotactic bacteria related to *Gammaproteobacteria* that produces magnetite; HSMV-1 a thermophilic vibrio that synthesizes magnetite magnetosomes and belongs to *Nitrospira* phylum. The structural study of "*Ca. M. multicellularis*" showed that cell adhesion is probably done

by carbohydrates found on the microorganism surface and that cellular interactions are essential for shape determination. Serial sections and tridimensional reconstruction showed that cell division occurs in the cell smallest axis and symmetrically. The tridimensional reconstruction also showed that magnetosome chains of each cell are aligned in relation to the others. During sampling it was observed the presence of a multicellular forma similar to "*Ca. M. multicellularis*" that did not respond to the magnetic field. Phylogenetic and morphological studies have shown that this microorganism is very similar to the magnetotactic species except for the absence of magnetosomes, which suggests that genes responsible for greigite biomineralization can be also organized in a magnetosome island and undergo lateral gene transfer. The main conclusions of this thesis are: magnetotactic bacteria can be found in extreme environments, having psychrophile and thermophile behavior, greigite magnetosome formation may be related to genes also organized in a genomic island; cellular organization in "*Ca. M. multicellularis*" might occur because of carbohydrates on cell surface and/or adhesion molecules that depend on calcium; these adhesion factors seems to participate on the multicellular life cycle proposed for the microorganism.

Key-words: extreme environments, diversity, magnetotactic bacteria, multicellular magnetotactic prokaryotes, morphology and ultrastructure.

Rio de Janeiro

2010

INDICE

1. Introdução	14
1.1 Bactérias magnetotáticas	14
1.2 Diversidade morfológica e filogenética	15
Figura 1	16
1.3 Características dos magnetossomos e sua formação	19
1.4 Bactérias magnetotáticas encontradas em ambientes extremos	23
Figura 2	24
Figura 3	27
2. Justificativa e objetivos	28
2.1 Justificativa	28
2.2 Objetivos	29
3. Materiais e métodos	30
3.1 Locais de coleta	30
3.2 Coleta das amostras	30
3.3 Concentração magnética	30
3.4 Microscopia de luz, fluorescência e vídeo microscopia	31
3.5 Análise de imagens	32
3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	32
3.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	33
3.7.1 Preparação de amostras contendo células inteiras	33
3.7.2 Citoquímicas	33
3.7.3 Corte seriado e reconstrução tridimensional	35
3.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	35
3.8.1 PCR do gene <i>rrs</i>	35
3.8.2 PCR dos genes <i>ftsZ</i> , <i>mreB</i> e <i>aprA</i>	36
3.9 Clonagem e sequenciamento	36
3.10 Análise filogenética	37
3.11 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	37
4. Resultados	38
4.1 Morfologia e filogenia de bactérias magnetotáticas encontradas no Vale da Morte	38
Figura 4	41
Figura 5	41
Figura 6	41
Figura 7	43
Figura 8	43
Figura 9	45
Figura 10	45
Figura 11	45
Figura 12	45
Figura 13	47
Figura 14	47
Figura 15	47
4.2 Morfologia e filogenia de bactérias encontradas em fontes termais de Gerlach e Pyramid Lake	49
Figura 16	52
Figura 17	52
Figura 18	52

Figura 19	52
Figura 20	54
Figura 21	54
Figura 22	54
Figura 23	54
Figura 24	56
Figura 25	56
Figura 26	56
Figura 27	56
4.3 Morfologia e filogenia de procariotos multicelulares magnetotáticos encontrados em <i>Salton Sea</i>	58
Figura 28	59
Figura 29	59
Figura 30	59
Figura 31	59
Figura 32	59
4.4 Morfologia de bactérias magnetotáticas encontradas na Antártica	61
Tabela 1	62
Figura 33	63
Figura 34	63
Figura 35	63
Figura 36	63
Figura 37	63
Figura 38	63
Figura 39	65
4.5 Diversidade, fisiologia e interações interespecíficas de “Ca. M. multicelulares”	67
Figura 40	69
Figura 41	71
Figura 42	73
Figura 43	73
Figura 44	73
Figura 45	75
Figura 46	75
4.6 Ultraestrutura de “Ca. M. multicelulares”	77
4.6.1 Adesão celular	77
Figura 47	79
Figura 48	79
Figura 49	79
Figura 50	79
Figura 51	79
Figura 52	81
Figura 53	81
Figura 54	81
Figura 55	81
Figura 56	81
4.6.2 Reconstrução tridimensional e elementos de citoesqueleto	83
Figura 57	85
Figura 58	85
Figura 59	85
Figura 60	85

Figura 61	85
Figura 62	87
5. Discussão	89
5.1 Distribuição de bactérias magnetotáticas em ambientes extremos	89
5.2 Procariotos multicelulares magnéticos e não magnéticos	91
5.3 Interações interespecíficas envolvendo bactérias magnetotáticas	94
5.4 Relações intercelulares e de possíveis estruturas envolvidas na manutenção da forma das células e organização multicelular de “ <i>Ca. M. multicellularis</i> ”	95
6. Conclusões	99
7. Referências bibliográficas	101

LISTA DE ABREVIATURAS

BW-1	<i>Bad water -1</i>
BW-2	<i>Bad water- 2</i>
CEMOVIS	microscopia eletrônica de seções vítreas
EDS	espectroscopia de dispersão de energia de raios-X (<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EGTA	ácido etileno glycol tetracético (<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>)
FISH	hibridização <i>in situ</i> fluorescente (<i>fluorescent in situ hybridization</i>)
HSMV-1	<i>hot spring magnetic vibrio -1</i>
MC-1	<i>magnetic coccus -1</i>
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MMP	procarioto multicelular magnetotático (<i>multicellular magnetotactic prokaryote</i>)
MMS	espirilo magnetotático microaerófilo (<i>microaerophilic magnetotactic spirilla</i>)
MSM	espirilo magnético marinho contendo magnetita (<i>Marine magnetite-containing magnetic spirillum</i>)
MV-1	vibrião magnético -1 (<i>magnetic vibrio -1</i>)
nMMP	procarioto multicelular não magnetotático
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polimerase chain reaction</i>)
rRNA 16S	subunidade menor do ribossomo de procariotos
rrs	gene que codifica o rRNA 16S

1. Introdução

1.1 Bactérias magnetotáticas

As bactérias magnetotáticas são capazes de responder a campos magnéticos devido à presença de nano-partículas ricas em ferro em seu citoplasma chamadas de magnetossomos (BLAKEMORE, 1975). Segundo a literatura, as bactérias magnetotáticas são encontradas em ambientes aquáticos, sendo já descritas em sedimentos, colunas estratificadas de água (SCHÜLER & FRANKEL, 1999) e solos alagados (FASSBINDER, STANJEK & VALI, 1990). Todos ambientes onde encontram-se bactérias magnetotáticas são mesofílicos e de pH próximo ao neutro (BAZYLINSKI & WILLIAMS, 2007).

A orientação ao longo de campos magnéticos parece ser vantajosa para essas bactérias porque, em ambientes caracterizados por estratificação química vertical, elas usam o campo geomagnético para encontrar regiões adequadas para crescimento e/ou sobrevivência. Assim, o deslocamento das bactérias ao longo do gradiente vertical de oxigênio é facilitado pela orientação ao longo do campo geomagnético, reduzindo um problema tridimensional de procura por localização e manutenção em uma concentração ótima de oxigênio, para um problema unidirecional, o que aumenta a eficiência da resposta aerotática (FRANKEL *et al.*, 1997). O gradiente químico mais estudado e relacionado com o comportamento magnetotático é o do oxigênio, no entanto, nutrientes e outros aceptores de elétrons já são também considerados nesse cenário (FRANKEL, WILLIAMS & BAZYLINSKI, 2007).

O comportamento magnetotático apresentado por essas bactérias é uma orientação passiva, isto é, elas não são atraídas ou repelidas pelo campo magnético, mas sim apenas orientadas e se locomovem devido à propulsão flagelar. A disposição dos flagelos, no entanto, varia de acordo com a espécie de bactéria magnetotática, uma vez que estas possuem morfologias distintas. Aliás, não só a morfologia desse grupo de bactérias apresenta grande variedade como também a filogenia e fisiologia. Características comuns dentro desse grupo heterogêneo de procariotos são: (1) todos os representantes descritos até o momento são membros Gram-negativos pertencentes ao domínio *Bacteria*; (2) são móveis devido à presença de flagelos; (3) exibem comportamento tático negativo em relação a concentrações atmosféricas de oxigênio; (4) todas as estirpes cultivadas em cultura

pura apresentam metabolismo respiratório, com apenas uma exceção e (5) todos apresentam magnetossomos, que são a “assinatura” morfológica do grupo (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2003).

Os magnetossomos são considerados organelas responsáveis pela orientação das bactérias magnetotáticas ao longo das linhas do campo geomagnético. Estes estão geralmente organizados em cadeias, funcionando como uma bússola intracelular (SPRING & BAZYLINSKI, 2000). Cada magnetossomo é formado por um cristal magnético envolto por membrana lipoprotéica cuja composição difere da membrana celular (BALKWILL, MARATEA & BLAKEMORE, 1980; GORBY, BEVERIDGE & BLAKEMORE, 1988). Na maioria das bactérias magnetotáticas descritas até hoje, os magnetossomos são constituídos de magnetita (Fe_3O_4) (SPRING & BAZYLINSKI, 2000), mas também são encontrados cristais de sulfeto de ferro como a greigita (Fe_3S_4) em alguns microrganismos que vivem em ambientes ricos em H_2S (FARINA, ESQUIVEL & LINS DE BARROS, 1990; MANN *et al.*, 1990; PÓSFAL *et al.*, 1998). Embora a maioria das bactérias magnéticas produza somente um tipo de mineral, já foram descritos casos em que magnetossomos de óxido de ferro e de sulfeto de ferro foram encontrados na mesma célula (BAZYLINSKI *et al.*, 1993, 1995; LINS *et al.*, 2007).

Apenas alguns representantes deste grupo variado de microrganismos foram isolados em culturas axênicas e poucos foram descritos adequadamente na literatura. As espécies cultivadas mais estudadas pertencem ao gênero *Magnetospirillum*, que incluem *M. magneticum*, *M. magnetotacticum*, *M. gryphyswaldense*. Outras bactérias também cultivadas são os espirilos MMS-1 a MMS-9, um coco bem caracterizado denominado MC-1, vibriões magnéticos MV-1 e MV-2 e um vibrião denominado *Desulfovibrio magneticus* (FAIVRE & SCHÜLER, 2008). Todas as bactérias disponíveis em cultura citadas acima produzem magnetossomos contendo cristais de magnetita.

1.2 Diversidade morfológica e filogenética

A diversidade desse grupo de procariotos é caracterizada pelo grande número de morfotipos, incluindo cocos, bacilos, vibriões, espirilos e formas multicelulares, distribuídos em diversos grupos não relacionados filogeneticamente (Figura 1). O tipo mais abundante no ambiente, especialmente em sedimentos, são células cocóides com dois tufo de flagelos localizados em um hemisfério da célula (SPRING & BAZYLINSKI, 2000).

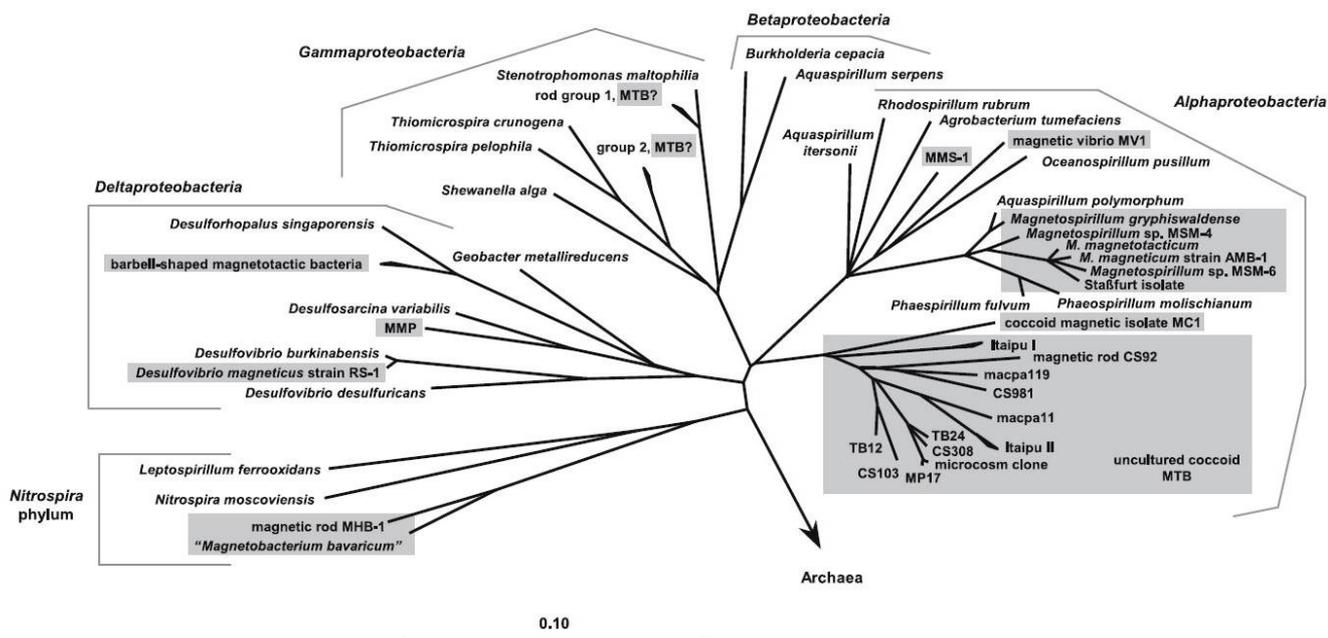


Figura 1 Árvore filogenética baseada no rRNA 16S mostrando a filogenia das bactérias magnetotáticas (caixas cinza). Retirada de AMANN, PEPLIES & SCHÜLER, 2007.

A maioria das bactérias magnetotáticas descritas até o momento pertence à classe *Alphaproteobacteria*. Dentre elas estão as espécies pertencentes ao gênero *Magnetospirillum* que são encontradas em ambientes de água doce, geralmente em menor número quando comparados aos cocos magnéticos. Esses espirilos têm dimensões variando entre 0,2 a 0,4 por 4,0 a 6,0 μm e produzem cristais de magnetita de 40 a 50 nm organizados em uma única cadeia (AMANN, PEPLIES & SCHÜLER, 2007). *M. magnetotacticum* foi a primeira bactéria magnética isolada e crescida em cultura pura, sendo originalmente classificada como membro do gênero *Aquaspirillum* baseado em várias características fenotípicas (MARATEA & BLAKEMORE, 1981). Os conhecimentos sobre o metabolismo e a bioquímica das bactérias magnetotáticas são baseados, principalmente, em experimentos realizados com espécies desse gênero, *M. magnetotacticum* e *M. gryphiswaldense* (SPRING & BAZYLINSKI, 2000). Outros espirilos, também isolados de ambientes de água doce, mas não caracterizados completamente são os espirilos MSM-3 e MSM-4. Espécies de espirilos marinhos denominados MMS-1 e MMS-2 também foram isoladas. Esses espirilos são de dimensões variando de 1 a 3 μm e ainda não foram

bem caracterizados, mas já se sabe que são possivelmente um novo gênero dentro da classe *Alphaproteobacteria*, sendo mais relacionado ao vibrião MV-1 do que as espécies de espirilos de água doce, possuindo, inclusive metabolismo semelhante (BAZYLINSKI & WILLIAMS, 2007).

A cepa MV-1, a ser denominado *Magnetovibrio blakemorei* por D.A. Bazylinski (informação pessoal), é um vibrião marinho magnetotático isolado de um pântano salino no estuário do Rio Neponset, Massachusetts, EUA (BAZYLINSKI, FRANKEL & JANNASCH, 1988). Suas células são pequenas, variando de 1-5 µm por 0,2-0,5 µm, com um único flagelo polar e produzem cristais de magnetita de aproximadamente 53 por 35 nm. São nutricionalmente versáteis podendo crescer heterotroficamente na presença de fontes de energia de origem orgânica e, autotroficamente com sulfeto ou tiosulfato como doadores de elétrons (BAZYLINSKI, 1999). Outra alfa-proteobactéria disponível em cultura é o coco magnético MC-1, a ser denominado *Magnetococcus marinus* por D.A. Bazylinski (informação pessoal). Esse coco possui diâmetro de 1 a 2 µm e contém cristais prismáticos de magnetita organizados em uma única cadeia (MELDRUM *et al.*, 1993). Outras espécies de bactérias magnetotáticas com características interessantes e pertencentes à classe *Alphaproteobacteria* que foram descritas, mas infelizmente ainda não foram cultivadas, incluem cocos, bastonetes e uma forma de cocos em cadeias curtas, denominada *barbell* (AMANN, PEPLIES & SCHÜLER, 2007).

Bactérias magnetotáticas pertencentes a outras classes dentro do filo *Proteobacteria* já foram descritas. *Desulfovibrio magneticus* é uma espécie de bactéria redutora dissimilatória de sulfato, isolada de ambiente rico em H₂S, capaz de produzir magnetossomos (SAKAGUCHI, ARAKAKI & MATSUNAGA, 2002). Suas células são bacilos de 0,9-1,5 µm por 3-5 µm e possuem um único flagelo polar. São capazes de produzir magnetita intracelular e extracelularmente (SAKAGUCHI, BURGESS & MATSUNAGA, 1993). As formas multicelulares de bactérias magnetotáticas também pertencem à classe *Deltaproteobacteria* e estas possuem características intrigantes que serão exploradas no tópico “Bactérias magnetotáticas encontradas em ambientes hipersalinos” (página 23). Ainda é controversa a existência de bactérias magnetotáticas pertencentes à classe *Gammaproteobacteria*. Simmons *et al.*, (2004), descreveram preliminarmente a existência de um bastonete de dimensões aproximadamente de 5 µm por 3 µm, produtor de greigita pertencente a esta classe quando estudavam amostras de

ambientes costeiros estratificados. Esses dados, no entanto, não foram confirmados.

Há ainda representantes de bactérias magnetotáticas no filo *Nitrospira*. “*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*” é uma bactéria não cultivada, encontrada em sedimentos do Lago Chiemsee (Alemanha), descrita em 1987 (VALI *et al.*, 1987), tendo recebido o status de *Candidatus* em 1993 (SPRING *et al.*, 1993). As células de “*Ca. M. bavaricum*” são bastonetes de grandes dimensões (1-1,5 x 6-9 µm) que possuem um tufo polar de flagelos. A característica mais marcante dessa espécie é a presença de um grande número de magnetossomos por célula, excedendo em muito o número necessário para eficiente orientação no campo magnético da Terra, o que a diferencia da maioria das bactérias magnetotáticas descritas até hoje. Seus magnetossomos consistem de cristais de magnetita em forma de ponta de lança, cujo tamanho varia entre 110-150 nm, organizados em diversas cadeias (SPRING & BAZYLINSKI, 2000). Em 2005, uma bactéria magnetotática semelhante à “*Ca. M. bavaricum*”, MHB-1, foi encontrada em um lago ao norte da Alemanha. A análise filogenética dessa bactéria identificou-a como pertencendo ao filo *Nitrospira*, tendo 91% de similaridade em relação ao gene que codifica o rRNA 16S (subunidade menor do ribossomo de procariotos) de “*Ca. M. bavaricum*”. Características, como morfologia da célula e forma dos cristais, também são semelhantes entre essas bactérias, mas o número de cristais, que em “*Ca. M. bavaricum*” é da ordem de milhares, era bem menor em MHB-1 (FLIES, PEPLIES & SCHÜLER, 2005).

Desde a descoberta das bactérias magnetotáticas, sua filogenia, incluindo a de bactérias não cultivadas, foi determinada pelo sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S. Inicialmente, foi possível agrupar a maioria das bactérias magnetotáticas no filo *Proteobacteria*, classes *Alphaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*. Na primeira são encontrados espirilos, bacilos, vibriões e cocos que produzem magnetita. Enquanto que na segunda estão as bactérias magnetotáticas não cultivadas que sintetizam cristais de sulfeto de ferro e estão relacionadas especificamente às bactérias dissimilatórias redutoras de sulfato. Posteriormente, foi relatada a existência de bactérias magnetotáticas que contêm inclusões de magnetita e não pertencem à classe *Alphaproteobacteria*, como é o caso do bastonete não cultivado “*Ca. M. bavaricum*” pertencente ao filo *Nitrospira* (SPRING *et al.*, 1993) e da espécie redutora de sulfato *Desulfovibrio magneticus*

que pertence a *Deltaproteobacteria* (SAKAGUCHI, ARAKAKI & MATSUNAGA, 2002). Devido à distribuição das bactérias magnéticas produtoras de magnetita em diferentes grupos filogenéticos, foi sugerido que a biomineralização intracelular da magnetita teria tido única origem evolutiva seguida de transferência lateral de genes entre grupos filogenéticos (KAWAGUCHI *et al.*, 1995) ou teria se originado diversas vezes na evolução (KAWAGUCHI *et al.*, 1995; DELONG, FRANKEL & BAZYLINSKI, 1993).

Recentes descobertas, como a descrição de uma região do genoma que possui os genes envolvidos na formação dos magnetossomos, permitiram a obtenção de mais informações sobre a evolução da magnetotaxia. O conteúdo dessa região e as conclusões sobre a evolução da magnetotaxia obtidos a partir do estudo desses genes serão discutidos no próximo tópico.

1.3 Características dos magnetossomos e sua formação

A biomineralização é o processo de formação de minerais em sistemas biológicos. A produção do mineral pode ocorrer através de dois tipos de processos, biologicamente induzido ou controlado. O primeiro é aquele em que o organismo não determina a direção do crescimento, nem o tamanho do mineral formado, tendo seu papel limitado a ser um suporte ou catalisador do aumento de substâncias necessárias para a formação do cristal. No caso da biomineralização biologicamente controlada, o organismo determina o mineral a ser formado, a direção do crescimento e o tamanho, que é o caso da síntese dos magnetossomos por bactérias magnetotáticas (LOWENSTAM & WEINER, 1989).

Como mencionado anteriormente, o termo “magnetossomo” se refere aos cristais magnéticos intracelulares envoltos por membrana lipoprotéica (BALKWILL, MARATEA & BLAKEMORE, 1980; GORBY, BEVERIDGE & BLAKEMORE, 1988). Os magnetossomos são constituídos de magnetita (Fe_3O_4) (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004) ou greigita (Fe_3S_4) (FARINA, ESQUIVEL & LINS DE BARROS, 1990; MANN *et al.*, 1990; PÓSFAL *et al.* 1998; BAZYLINSKI *et al.*, 1993, 1995; LINS *et al.*, 2007). O tamanho dos magnetossomos varia de 35 a 250 nm (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004; FARINA *et al.*, 1994). O cristal magnético dos magnetossomos possui diferentes formas dependendo da espécie de bactéria, podendo ser cubo-octaédricos, prismáticos ou em forma de ponta de lança quando compostos de magnetita (BAZYLINSKI *et al.*, 1995) ou, em forma de paralelepípedos ou cubo-octaédros com

bordas irregulares quando constituídos de greigita (PÓSFAL *et al.*, 1998). A morfologia dos magnetossomos é considerada espécie-específica, apesar de essa característica ainda não ter sido provada em cultura (FAIVRE & SCHÜLER, 2008). Em geral os cristais de magnetita são cristalograficamente perfeitos e possuem magnetização permanente. Essas características fazem com que os magnetossomos tenham grande potencial biotecnológico, uma vez que são facilmente dispersos em soluções aquosas, por serem envoltos por membrana, e de fácil recuperação através do uso de um campo magnético (ARAKAKI *et al.*, 2008). Algumas aplicações para os magnetossomos têm sido desenvolvidas, como contraste em ressonância magnética nuclear (GLEICH & WEIZENECKER, 2005), separação de células (MILTENYI *et al.*, 1990) e carreamento de medicamentos (PLANK *et al.*, 2003).

A formação dos magnetossomos não é totalmente entendida. Acredita-se que esse processo envolva as seguintes etapas: formação de uma vesícula, captura do ferro, transporte do ferro para a vesícula e mineralização controlada (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004). Estudos estruturais concluíram que a membrana do magnetossomo é formada a partir de uma invaginação da membrana celular e que esta ocorre antes que haja a formação do cristal magnético (KOMEILI *et al.*, 2004). Nas espécies *M. magnetotacticum* e *M. gryphiswaldense*, os magnetossomos são alinhados em uma única cadeia que é fixa na célula devido a função da proteína MamK, homóloga a actina, que forma uma rede de filamentos próxima a membrana citoplasmática da célula, e da proteína MamJ, que está presente na vesícula do magnetossomo e promove a ligação do mesmo ao filamento de MamK (KOMEILI *et al.*, 2006; SCHEFFEL *et al.*, 2006). Devido a essa organização em cadeia, o momento magnético de cada cristal é somado e a interação desse momento magnético total com o campo magnético local faz com que o microrganismo seja orientado ao longo das linhas do campo magnético local. Dessa forma, percebe-se a importância da organização dessas estruturas celulares na resposta ao campo magnético, uma vez que essa só é possível porque os magnetossomos estão alinhados em uma única cadeia fixa na célula.

Essas proteínas e muitas outras relacionadas à síntese dos magnetossomos estão localizadas em uma região genômica rica em elementos de inserção denominada ilha do magnetossomo (SCHÜBBE *et al.*, 2003). As proteínas codificadas pelos genes encontrados na ilha do magnetossomo são parcialmente caracterizadas ou não caracterizadas e ainda não se sabe quais genes são essenciais para a síntese

dos cristais. A maior parte das proteínas estudada até agora são relacionadas ao processo de cristalização, à forma do cristal, transporte de ferro, atividades redox ou organização dos magnetossomos em cadeia nas células (JOGLER & SCHÜLER, 2007). Algumas das proteínas não possuem homólogas em outros organismos e, portanto representam famílias de proteínas únicas em bactérias magnetotáticas. Análises bioquímicas de magnetossomos extraídos mostraram que algumas proteínas codificadas pela ilha do magnetossomo são típicas da membrana do magnetossomo (GRÜNBERG *et al.*, 2004).

Assim como qualquer outra ilha genômica, a ilha do magnetossomo provavelmente tem papel crucial na evolução das bactérias, uma vez que está envolvida na disseminação de diversos genes por transferência horizontal (JUHAS *et al.*, 2009). A maioria dos genes que formam a ilha do magnetossomo estão agrupados em quatro operons em *M. gryphiswaldense* e em outros espirilos de água doce, denominados *mamAB*, *mamGFDC*, *mms6* e *mamXY* (BAZYLINSKI & SCHÜBBE, 2007). O conteúdo e organização dos genes na ilha do magnetossomo variam, e muitas vezes alguns genes são deletados ou inseridos sem que haja alteração na formação dos magnetossomos (ULRICH *et al.*, 2005).

Com a finalidade de identificar os genes associados especificamente com o fenótipo magnetotático, Ritcher *et al.* (2007) compararam seqüências provenientes de quatro bactérias magnetotáticas, sendo elas os genomas quase completos de *M. gryphiswaldense* e *M. magnetotacticum* e os genomas completos de *M. magneticum* e do coco magnético MC-1, analisando-os contra 426 genomas completos de bactérias e arqueas disponíveis. Neste trabalho, um genoma *core* para bactérias magnetotáticas foi descrito. Esse genoma contém 891 genes compartilhados entre as espécies magnetotáticas estudadas. Além disso, 152 genes foram descritos como específicos para o gênero *Magnetospirillum* e 28 genes identificados como grupo específico, que ocorrem em todas as bactérias magnetotáticas estudadas e não exibem ou exibem remota similaridade em relação aos organismos não magnetotáticos. Esses genes específicos incluem os genes *mam* e *mms* conhecidos por controlar a formação do magnetossomos, sendo que 10 deles se encontram fora da ilha do magnetossomo em *M. gryphiswaldense*. Esses genes específicos representam menos de 1% do total de quadros abertos de leitura e a maioria tem função desconhecida, mas acredita-se que estejam atuando especificamente na magnetotaxia (RITCHER *et al.*, 2007).

Recentemente, genes dessa ilha foram comparados em cinco bactérias magnetotáticas cultivadas, *M. gryphiswaldense*, *M. magnetotacticum*, *M. magneticum*, MV-1 e MC-1, e os resultados mostraram que elas diferem em conteúdo e organização, sendo esta uma possível causa para a diversidade de biomineralização, morfologia e magnetotaxia (JOGLER *et al.*, 2009a). Genes identificados como conservados foram *mamH*, I, E, K, M, O, P, A, Q, B, S, T, C, D, Z e X, assim como *mms6* e *mmsF*. Baseado na filogenia e na composição da ilha do magnetossomo também foi sugerido um modelo para a evolução da magnetotaxia em *Alphaproteobacteria*; nesse os genes responsáveis pela formação do magnetossomo foram passados de um ancestral não conhecido de magnetoespirilos para espécies de MC-1 e MV-1.

Outro estudo comparativo usando amostras ambientais que continham bactérias morfológicamente similares às cultivadas mostrou que as bactérias não cultivadas tinham ilhas de magnetossomos semelhantes às cultivadas, porém com organização diferente (JOGLER *et al.*, 2009b). O fato de o estudo ter sido realizado em bactérias que produzem magnetossomos de composição idêntica, e de forma e organização semelhantes aos das bactérias magnetotáticas já cultivadas, diminui a chance de se encontrar novos genes envolvidos na formação do magnetossomo. Novamente, através desse estudo comparativo foi concluído que genes da ilha do magnetossomo em diferentes espécies de bactérias magnetotáticas cultivadas e não cultivadas não estão presentes em todos os casos e que sua organização também varia, o que poderia ser a causa da existência de cristais magnéticos com diferentes características (JOGLER *et al.*, 2009a, 2009b).

Infelizmente, existem poucas espécies de bactérias magnéticas em cultura e todas elas produzem magnetossomos de magnetita com morfologia semelhante, o que dificulta o estudo geral da biomineralização, ou seja, da formação dos magnetossomos. Acredita-se que a greigita é formada a partir de sulfeto de ferro cúbico, que é transformado em mackinawita e depois em greigita pelo processo de transformação no estado sólido (PÓSFAL *et al.*, 1998). Estudos estruturais feitos em bactérias magnetotáticas produtoras de magnetossomos de greigita mostraram que esses cristais não devem estar sob um controle tão estrito durante sua síntese como ocorre para os magnetossomos de magnetita (ARATÓ *et al.*, 2005) e que o processo de formação dos magnetossomos deve ocorrer de maneira semelhante ao da magnetita, iniciando pela invaginação da membrana, nucleação e crescimento do

cristal (ABREU *et al.*, 2008).

Por sintetizarem magnetossomos, bactérias magnetotáticas acumulam cerca de 3% de ferro em relação a seu peso seco, o que faz com que sejam potenciais participadoras no ciclo do ferro (BLAKEMORE, 1982). No entanto, apesar de acumular cerca de 170 vezes mais ferro que uma bactéria não-magnetotática, como a *Escherichia coli* (MATSUNAGA & SAKAGUCHI, 2000), por exemplo, ainda não se chegou a uma conclusão definitiva a respeito do seu papel nesse ciclo biogeoquímico. Estudos mostram que a população de bactérias magnéticas em ambientes marinhos pode alcançar valores de até 10^4 células / mL e estima-se que a quantidade de ferro imobilizada dentro dos magnetossomos seja de 10^{-15} a 10^{-13} g de ferro por célula. Assim, elas podem estar precipitando intracelularmente de 0,5 a 13% do fluxo de ferro do ambiente (SIMMONS, BAZYLINSKI & EDWARDS, 2007).

1.4 Bactérias magnetotáticas encontradas em ambientes extremos

Até o momento as bactérias magnetotáticas foram caracterizadas em ambientes mesofílicos e não há registro da existência dessas bactérias em ambientes com alguma característica extrema. A única característica que se pode ser considerada extrema em locais onde são encontradas bactérias magnetotáticas é a hipersalinidade. “*Ca. M. multicellularis*” é um procarioto multicelular magnetotático (MMP) encontrado na Lagoa de Araruama que possui salinidade uma vez e meia superior a do mar. Esse microrganismo tem sido muito estudado nos últimos anos, no entanto, detalhes sobre fatores envolvidos na forma das células e em sua organização multicelular ainda não foram estudados completamente.

MMPs foram descritos pela primeira vez em 1983 como um agregado de células que se move como uma unidade (FARINA *et al.*, 1983). Esse microrganismo, encontrado no sedimento da Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio de Janeiro, foi descrito como um microrganismo complexo de 5,0 a 7,0 μm , formado por aproximadamente 15 a 25 células individuais separadas por dupla membrana e superfície externa recoberta por fibras abundantes com arranjo radial (FARINA *et al.*, 1983). Até hoje, os MMPs não foram cultivados e os estudos desses microrganismos são feitos a partir do isolamento direto de amostras do ambiente.

Microrganismos semelhantes aos encontrados na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio de Janeiro (FARINA *et al.*, 1983), já foram observados em sedimentos de ambientes marinhos ou de água salgada ricos em H_2S na América do Norte (MANN

et al., 1990). Os encontrados em New England (EUA) apresentam o diâmetro variando de 3,0 a 12,5 μm , são formados por 10 a 30 células, e foram chamados de “many-celled magnetotactic prokaryote” ou MMP (RODGERS *et al.*, 1990). Em 2004, outra forma multicelular de bactéria magnetotática foi encontrada em uma lagoa hipersalina no estado do Rio de Janeiro (KEIM *et al.*, 2004a). Devido à sua abundância nesse local e ao fato de essa ser a única bactéria magnetotática nas presentes nas amostras foi possível estudar características que permitiram nomear esse microrganismo como “*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*” (ABREU *et al.*, 2007). MMPs foram também encontrados em *Pointe Rouge* em Marselha, França (LEFÈVRE *et al.*, 2007) e no Mar do Norte, Alemanha, sendo nesse caso denominado “*Candidatus Magnetomorum litorale*” (WENTER *et al.*, 2009). Todos esses MMPs são muito semelhantes em relação a sua morfologia, exceto pelo de Marselha (Figura 2). Apesar de terem sido encontrados em locais distintos, o estudo dos MMPs apontam semelhanças em relação à morfologia, movimentação e filogenia.

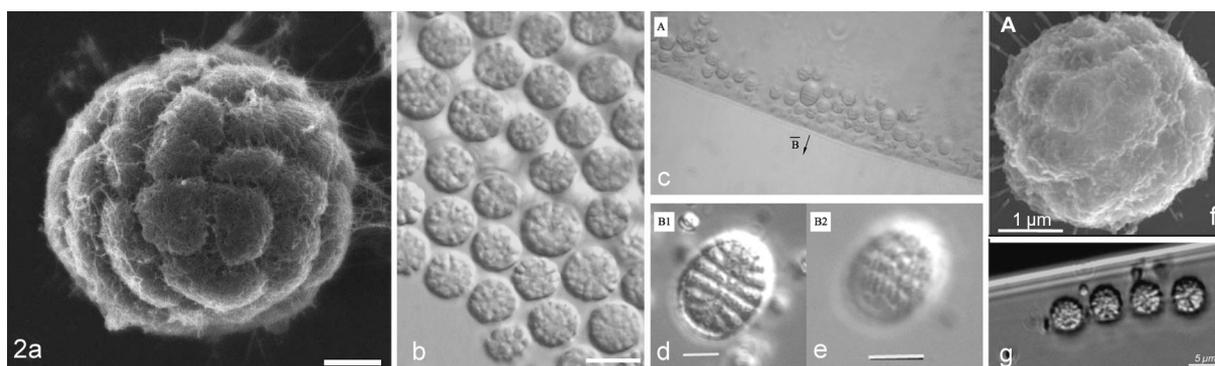


Figura 2 Micrografias mostrando a morfologia dos MMPs encontrados em diferentes locais (a) microscopia eletrônica de varredura e (b) microscopia de contraste interferencial diferencial de “*Ca. M. multicellularis*” (Brasil; retirado de KEIM *et al.*, 2004a); (c), (d) e (e) contraste interferencial diferencial de MMPs encontrados em Marselha (França; retirado de LEFÈVRE *et al.*, 2007) ; (f) microscopia eletrônica de varredura e (g) microscopia óptica de “*Ca. M. litorale*” (Alemanha; retirada de WENTER *et al.*, 2009). A barra de escala indica 1 μm in (a) e (f), 10 μm em (b) e 5 μm em (d), (e) e (g).

Quanto à morfologia, cada MMP possui de 7 a 30 células Gram-negativas (KEIM *et al.*, 2007) organizadas lado a lado em uma esfera de aproximadamente 3 a 12 μm . Os MMPs de Marselha apresentam diferentes morfologias com tamanhos variando de 15 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ e 7 $\mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$, sendo chamados de ‘*pineapple*’ e ‘*blackberry*’, respectivamente (LEFÈVRE *et al.*, 2007). Cada uma das células contém aproximadamente 55 magnetossomos (RODGERS *et al.*, 1990; ABREU *et*

al., 2008), grânulos de polihidroxialcanoatos, grandes inclusões de lipídeos e, raramente, grânulos ricos em fósforo (SILVA *et al.*, 2008).

A análise da composição dos magnetossomos mostrou que eles são formados por sulfetos de ferro e em alguns casos foi possível observar uma camada amorfa rica em oxigênio e ferro em sua superfície (FARINA, ESQUIVEL & LINS DE BARROS, 1990; LINS & FARINA, 1999). Posteriormente, os cristais de sulfeto de ferro foram identificados como greigita (PÓSFAI *et al.*, 1998). Os magnetossomos dos MMPs tem forma irregular quando comparados a outras bactérias magnetotáticas e também são organizados em cadeias (FARINA *et al.*, 1983; LINS & FARINA, 1999) próximas a periferia do microrganismo, paralelos à superfície (SILVA *et al.*, 2007; KEIM *et al.*, 2004a). Magnetossomos de sulfeto de ferro e em forma de ponta de lança, alinhados em algumas cadeias paralelas nas células, foram descritos para “*Ca. Magnetomorum litorale*” (WENTER *et al.*, 2009). Recentemente, MMPs contendo magnetossomos pleomórficos de greigita e magnetossomos em forma de ponta de lança de magnetita foram descritos (LINS *et al.*, 2007). A presença de uma estrutura estriada de natureza desconhecida foi observada próxima aos magnetossomos (FARINA *et al.*, 1983; SILVA *et al.*, 2007).

O formato das células dos MMPs foi descrito como piramidal. As células que formam o microrganismo são polarizadas, tendo uma face multiflagelada voltada para o ambiente externo e outra face voltada para um compartimento interno acelular (KEIM *et al.*, 2007). Quando os MMPs são expostos a diferentes pressões osmóticas, as células desagregam e não respondem ao campo magnético, nem se movimentam (LINS & FARINA, 1999), enfatizando assim o comportamento integrado do microrganismo. Células isoladas nunca foram observadas (FARINA, ESQUIVEL & LINS DE BARROS, 1990) e quando desagregadas perdem a viabilidade e, conseqüentemente, motilidade e a capacidade de orientação ao longo do campo magnético (ABREU *et al.*, 2006).

Quanto à motilidade, as células de “*Ca. M. multicellularis*” possuem cerca de 30 flagelos de 2,4 μm de comprimento e 15,9 nm de espessura, distribuídos em sua porção voltada para o ambiente externo, resultando na flagelação peritríquia do microrganismo (SILVA *et al.*, 2007). Os tipos de movimento descritos em todos os MMPs são: (1) movimento livre, (2) rotação, (3) *walking* e (4) *escape*. Em um campo magnético uniforme os MMPs apresentam o movimento livre que são trajetórias helicoidais com velocidade de aproximadamente 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ (KEIM *et al.*, 2007;

ABREU *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007). Quando observados na borda da gota, os MMPs apresentam o movimento de rotação, em que giram em torno de seu próprio eixo, e o movimento de escape, também chamado de *ping-pong*, que é caracterizado como um movimento reverso uniforme acelerado por dezenas ou centenas de micrômetros em que o microrganismo atinge 170 $\mu\text{m/s}$ e depois desacelera em um movimento para frente (FARINA *et al.*, 1983; GREENBERG *et al.*, 2005). O *ping-pong* é um movimento influenciado pela força do campo magnético (GREENBERG *et al.*, 2005) e foi proposto como uma maneira de escapar de predadores e/ou condições ambientais desfavoráveis (MARTINS *et al.*, 2007). O movimento *walking* é caracterizado por ser de trajetória livre e complexa na interface ar-água, mantendo o sentido da rotação do corpo do microrganismo (KEIM *et al.*, 2007; ABREU *et al.*, 2007).

Quanto à filogenia, todos os estudos realizados até o momento mostram que os MMPs pertencem a classe *Deltaproteobacteria*, sendo a espécie cultivada mais relacionada a eles *Desulfosarcina variabilis* (DELONG, FRANKEL & BAZYLINSKI, 1993; ABREU *et al.*, 2007; SIMMONS & EDWARDS, 2007; WENTER *et al.*, 2009). Infelizmente, não existem estudos filogenéticos para os MMPs de Marselha, mas os resultados sobre a diversidade dos outros MMPs sugerem que estes representem diferentes espécies (SIMMONS & EDWARDS, 2007; ABREU *et al.*, 2007; WENTER *et al.*, 2009). Apesar da grande diversidade apresentada por esse grupo de microrganismos, já é aceito que as células que compõem um MMP possuem rRNAs 16S idênticos (KEIM *et al.*, 2004b; SIMMONS & EDWARDS, 2007; WENTER *et al.*, 2009).

A característica que mais impressiona a respeito dos MMPs é seu ciclo de vida exclusivamente multicelular. Keim *et al.* (2004b) propuseram um ciclo de vida para esse microrganismo, durante o qual as células de um agregado dobram seu volume, e em seguida dividem-se sincronicamente, dando origem a um microrganismo maior com a mesma forma esférica, porém com o dobro do número de células. Após este estágio, o microrganismo assume forma de elipse e em seguida, forma de oito, ocorrendo, então, a divisão de um microrganismo em dois organismos semelhantes (Figura 3). Além do ciclo de vida, existem outras características desse microrganismo que são únicas entre procariotos como uma divisão celular atípica que parece ser coordenada e sincrônica (KEIM *et al.*, 2004b) e a necessidade de organização multicelular para sobrevivência (ABREU *et al.*,

2006).

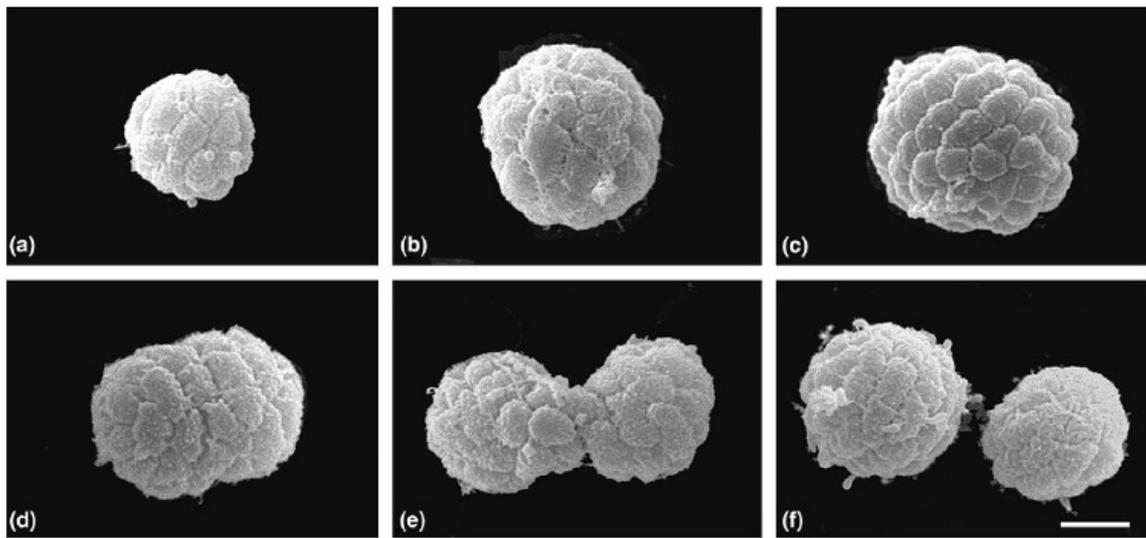


Figura 3 Ciclo de vida exclusivamente multicelular proposto para “*Ca. M. multicellularis*”. A barra de escala indica 4 μm . Retirado de KEIM *et al.*, 2004b.

2. Justificativa e objetivos

2.1 Justificativa

Diversos estudos recentes sugerem que a diversidade de bactérias magnetotáticas está longe de estar completamente explorada (AMANN, PEPLIES & SCHÜLER, 2007). Após descoberta da ilha do magnetossomo, foi sugerido que a capacidade de produção de magnetita poderia não ser monofilética e, assim, o estudo comparativo de diferentes espécies ajudaria na compreensão da evolução da magnetotaxia. Estudos sobre a diversidade morfológica e filogenética do grupo também podem contribuir substancialmente para a caracterização do processo de formação dos magnetossomos de greigita, da diversidade genética envolvida na biomineralização dessas estruturas e determinação da real participação das bactérias magnetotáticas no ciclo do ferro, uma vez que é possível a obtenção de dados refinados pelo uso de técnicas modernas que não necessitam de abundância de células, o que só seria obtida através de cultura pura.

Dessa forma, nesta tese, pretendeu-se ampliar a gama de ambientes onde são encontradas bactérias magnetotáticas através de sua busca em ambientes extremos, seguida de sua caracterização morfológica e filogenética. No caso de "*Ca. M. multicellularis*" procurou-se aumentar a base de conhecimentos sobre o microrganismo através do estudo das relações intercelulares e elementos intracelulares que possam estar envolvidos na morfogênese multicelular peculiar desse microrganismo.

2.2 Objetivos

Os objetivos específicos são:

1. Determinar a existência de bactérias magnetotáticas em ambientes extremos como desertos, fontes termais e ambientes polares;
2. Estudar a morfologia e ultraestrutura das bactérias magnetotáticas de ambientes extremos, incluindo a caracterização da forma, organização e composição dos magnetossomos por microscopia eletrônica;
3. Determinar a filogenia das bactérias magnetotáticas presentes nas amostras dos ambientes extremos estudados baseando-se no gene *rrs*, que codifica o rRNA 16S;
4. Examinar a diversidade de “*Ca. M. multicellularis*” na Lagoa de Araruama e obter informações que ajudem a entender sua eco-fisiologia através do estudo de possíveis relações com outros microrganismos no ambiente e da detecção do gene *aprA*, relacionado à redução dissimilativa de sulfato;
5. Estudar as relações intercelulares que ocorrem em “*Ca. M. multicellularis*”, através do estudo da permeabilidade entre as células e caracterização de possíveis estruturas que estejam envolvidas na organização multicelular desse microrganismo;
6. Identificar genes relacionados a elementos de citoesqueleto em “*Ca. M. multicellularis*”
7. Estudar a divisão celular e sua relação com o ciclo de vida exclusivamente multicelular de “*Ca. M. multicellularis*”;
8. Determinar a forma das células de “*Ca. M. multicellularis*” e obter um modelo tridimensional do microrganismo.

3. Materiais e métodos

3.1 Locais de coleta

Amostras foram coletadas (1) na Lagoa de Araruama localizada no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, entre as latitudes de 22°50'S e 42°13'W; (2) em *Salton Sea* (33°N e 115°W), localizado no deserto do Colorado, Califórnia, EUA; (3) no Vale da Morte (36°14'N e 116°49'W), região do deserto de Mojave, Califórnia, EUA; (4) *Pyramid Lake* (40°03'N e 119°33'W), deserto de Mojave, Nevada, EUA; (5) em fontes termais encontradas na cidade de Gerlach (40°39' N e 119°21' W) localizada no deserto *Black rock*, Nevada, EUA; e (6) em Punta Ullman (62°04'S e 58°21'W) na Baía do Almirantado, Antártica, durante a 5ª e 6ª fase do XXVII Operantar.

3.2 Coleta das amostras

Amostras de água e sedimento da Lagoa de Araruama foram coletadas em recipientes plásticos de aproximadamente 15 litros e mantidas no laboratório à temperatura ambiente. As amostras de água e sedimento de *Salton Sea*, Vale da Morte, *Pyramid Lake* e *Gerlach* foram coletadas em recipientes plásticos de 1 litro e mantidos à temperatura ambiente, exceto pelas amostras de Gerlach que por se tratarem de amostras de fontes termais foram mantidas a 45° C. Sedimento e água coletados em recipientes plásticos de aproximadamente 1 litro em Punta Ullman foram transportados sob refrigeração para o Laboratório de Biologia e Ultraestrutura de Procariotos, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro. A temperatura durante o transporte não foi monitorada, mas acredita-se que as amostras tenham sido mantidas, pelo menos, a 4°C; a partir da chegada ao laboratório as amostras foram mantidas a 4°C.

Para as coletas realizadas em *Salton Sea*, Vale da Morte, *Pyramid Lake* e *Gerlach* a salinidade (refratômetro MISCO) e a temperatura foram medidas no local.

3.3 Concentração magnética

A presença de bactérias magnetotáticas nas amostras foi verificada pela observação de uma gota de sedimento e água, retirada de cada recipiente de amostra com auxílio de uma pipeta Pasteur descartável de 3 ml, ao microscópio óptico.

Para as amostras da Lagoa de Araruama a concentração magnética foi feita de acordo com Lins *et al.* (2003). Resumidamente, sedimento e água foram colocados em um recipiente apropriado para a concentração, e este foi exposto a um campo magnético gerado por uma bobina fabricada artesanalmente. Após aproximadamente uma hora, uma suspensão enriquecida em “*Ca. M. multicellularis*” foi coletada com auxílio de uma micropipeta e depositada em tubo de polipropileno de 1,5 ml em cuja parede externa havia um ímã colado. Alguns minutos depois, foram feitas, pelo menos, três lavagens usando água da lagoa filtrada em filtro 0,22 µm e autoclavada. Apesar de haver diversos microrganismos nas amostras coletadas, devido à dupla concentração magnética, a suspensão final continha predominantemente bactérias magnetotáticas. As amostras de Punta Ullman foram concentradas da mesma maneira, mas por 20 minutos a 4°C.

Depois de verificada a presença de bactérias magnetotáticas usando microscópio óptico, as amostras de *Salton Sea*, Vale da Morte, *Pyramid Lake* e *Gerlach* foram submetidas a concentração magnética inicial. Essa concentração consistiu na agitação da camada superior do sedimento e colocação de um ímã em uma das paredes da garrafa. Após 30 minutos, usou-se uma pipeta Pasteur para retirada da água próxima ao ímã, sendo esta enriquecida em bactérias magnetotáticas. Em alguns experimentos foi necessário o uso de uma amostra mais pura, como o preparo de grades para microscopia eletrônica de transmissão, hibridização *in situ* fluorescente e amplificação do gene *rrs*, e por isso, foi feita uma segunda concentração magnética foi feita usando a técnica de *race-track* (WOLFE *et al.*, 1987).

3.4 Microscopia de luz, fluorescência e vídeo microscopia

As amostras foram observadas ao microscópio Zeiss Axioplan 2 ou ao microscópio óptico Zeiss Axio Imager M1 equipados com acessórios para contraste interferencial diferencial de Nomarski, sistema para fluorescência e com câmera digital, Color View XS no primeiro caso e Axiocam MRm no segundo.

Ensaio de permeabilidade foram feitos usando o corante Lucifer yellow (Sigma), que é impermeável à membrana da célula. À suspensão de “*Ca. M. multicellularis*”, obtida através da concentração magnética, foi adicionada quantidade do corante adequada para que sua concentração de uso fosse 10 µg/ml.

Essas amostras foram observadas ao microscópio Zeiss Axioplan 2 equipado para fluorescência e com o conjunto de filtros 09 (emissão: 515 nm; excitação: 450-490).

A observação da interação entre “*Ca. M. multicellularis*” e de outras bactérias em amostras obtidas após concentração magnética foi feita pelo uso do corante de ácido nucléico Syto9 (Molecular Probes) e observação da amostra ao microscópio Zeiss Axioplan 2 equipado para fluorescência e com o mesmo conjunto de filtros citado acima.

As amostras preparadas de acordo com o item 3.10 foram observadas ao microscópio Axio Imager M1 equipado para fluorescência e com os conjuntos de filtros 02 (emissão: 420 nm; excitação: 365 nm), 09 (emissão: 515 nm; excitação: 450-490) e 50 (emissão: 690/50 nm; excitação: 640/30).

3.5 Análise de imagens

A análise de imagens dos magnetossomos obtidas por microscopia eletrônica de transmissão foi feita através do programa *analySIS*[®] (SIS GmbH). Os parâmetros de medidas utilizados foram: diâmetro máximo, diâmetro mínimo, e fator de forma (calculado por diâmetro máximo/diâmetro mínimo). Outras medidas foram feitas no programa *ImageJ* (Rasband, 1997-2009). Os dados relativos aos fatores de forma dos magnetossomos foram plotados em histogramas através do programa *Origin Pro 8* (OriginLab Corporation). Os gráficos das contagens de procariotos multicelulares foram feitos usando o programa *GraphPad InStat* (GraphPad Software, Inc.).

3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

“*Ca. M. multicellularis*” obtidos após concentração magnética e sem a etapa de lavagem em água filtrada foram aderidos em lamínulas, previamente tratadas com poli-L-lisina 0,1%. Após alguns minutos, as amostras foram fixadas por 1 hora, em glutaraldeído 2,5% em solução cacodilato de sódio 0,1M em água da lagoa estéril, pH 7,2. Posteriormente, foram feitas três lavagens de 15 minutos, usando solução cacodilato de sódio 0,1 M em água da lagoa estéril, pH 7,2. Após as lavagens, foi realizada a pós-fixação, no escuro, em tetróxido de ósmio 1% em solução cacodilato de sódio 0,1M em água da lagoa estéril por 1 hora. Novas lavagens usando a mesma solução foram feitas, as amostras foram desidratadas

em etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (duas vezes) por aproximadamente 15 minutos cada etapa, secas pela técnica do ponto crítico de CO₂ em aparelho Balzers Co.CPD 030 e metalizadas com ouro em aparelho Balzers Inc.. As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol FESEM 6340F em 5 kV.

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

3.7.1 Preparação de amostras contendo células inteiras

Para a caracterização morfológica das bactérias encontradas em *Salton Sea*, Vale da Morte, *Pyramid Lake* e *Gerlach*, grades de cobre revestidas com formvar foram preparadas adicionando uma gota da suspensão obtida na concentração magnética. Após alguns minutos a grade foi lavada em água destilada. No caso do preparo das grades com bactérias magnetotáticas, usou-se um ímã que direcionava seu nado para aumentar o número de bactérias aderidas ao filme. Para contrastação negativa, foi adicionada à grade uma solução de molibdato de amônio 1% após a lavagem com a água destilada. Depois de 1 minuto, a grade foi lavada novamente. As amostras foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G² F30 Super-Twin em 300 kV no modo convencional de campo claro ou no modo de alta resolução. A transformada de Fourier rápida foi aplicada nas imagens de alta resolução de forma a se obter o espectro de Fourier. A distribuição de elementos na amostra foi determinada usando a espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) no modo de varredura do MET. No MET Tecnai G² F30 Super-Twin ainda foi possível fazer difração de elétrons de área selecionada e mapeamento de elementos através da imagem de energia filtrada (Gatan GIF 2000; Gatan Inc., Pleasanton, CA). Todas as imagens foram adquiridas com uma câmera CCD; no caso da MET de alta resolução foi utilizado o filtro citado acima.

3.7.2 Citoquímicas

A MET foi utilizada em "*Ca. M. multicellulares*" visando à observação de estruturas celulares possivelmente relacionadas à organização multicelular do microrganismo. Assim, citoquímicas específicas para identificação de carboidratos e preservação de estruturas ricas em cálcio foram utilizadas.

A citoquímica de Thiery (SOUZA, 1998) detecta a presença de carboidratos quando esses apresentam hidroxilas vicinais susceptíveis à oxidação por ácido

periódico, levando a formação de grupos aldeídicos que por sua vez reduzem soluções de prata, o que revela a presença dos carboidratos. Para a técnica de Thiery amostras obtidas através da concentração magnética foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1M, em água da lagoa filtrada em filtro 0,22 μ m, pH 7,2; lavadas três vezes no mesmo tampão por 15 minutos; desidratadas em acetona 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (duas vezes) por aproximadamente 10 minutos cada, à temperatura ambiente; incluídas em resina epóxi (Polybed 812) e polimerizados em estufa de 60°C por 72 horas. Os blocos foram cortados em ultramicrótomo Leica LKB. Os cortes ultrafinos obtidos foram tratados em ácido periódico 1% por 30 minutos; lavados em água destilada; tratados com tiosemicarbazida 1% em ácido acético 10% por 48 horas; lavados três vezes em ácido acético 10%, uma vez em ácido acético 5% e três vezes em água destilada por 10 minutos; tratados com solução de proteinato de prata 1% protegido da luz e lavados em água destilada. Os controles foram feitos da mesma maneira exceto pela incubação em ácido periódico, que foi omitida. Os cortes não foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

Outras citoquímicas utilizadas visavam a identificação de estruturas ricas em cálcio, sendo estas a técnica do piroantimoniato de potássio e de detecção de sítios de afinidade por cálcio (BENCHIMOL, 1998). No protocolo usando o piroantimoniato de potássio, os microrganismos foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2); lavados 2 vezes no mesmo tampão e duas vezes em tampão fosfato de potássio (pH 7,5); pós fixados usando solução de tetróxido de ósmio 1% contendo piroantimoniato de potássio a 2,5% em tampão fosfato de potássio (pH entre 7,4 e 7,8) a 4°C. Posteriormente, a amostra foi lavada em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,5) duas vezes à temperatura ambiente. A desidratação, impregnação com resina e polimerização foram feitas da mesma forma descrita anteriormente. Para a técnica de detecção de sítios de afinidade de cálcio, cloreto de cálcio foi adicionado ao tampão cacodilato de sódio, sendo sua concentração final 5 mM, com as demais etapas sendo as mesmas. Os controles para ambas as técnicas foi a imersão das grades contendo os cortes em EGTA 5 mM por 30 minutos a 60°C seguida de lavagem em água destilada.

Todas as amostras foram cortadas em ultramicrótomo Leica LKB usando navalha de diamante. As grades do material preparado para detecção de cálcio foram contrastadas com acetato de uranila 2,5% por 20 minutos e citrato de chumbo por 1

minuto. As grades foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni em 80 kV.

3.7.3 Corte seriado e reconstrução tridimensional

A reconstrução tridimensional foi feita visando obter informações sobre a organização das células que compõem o microrganismo e algumas estruturas celulares que serão detalhadas posteriormente. Cortes seriados de 60–100 nm de espessura foram feitos em ultramicrotomo Leica EM UC6 a partir do material preparado de acordo com a citoquímica de sítios de afinidade de cálcio, uma vez que esta apresentou ótima qualidade na preservação da amostra. As séries de cortes foram depositadas em grades de cobre com uma fenda central e revestidas com filme de formvar. Os cortes foram contrastados em solução de acetato de uranila 2,5% por 30 minutos e citrato de chumbo por 1 minuto e observados ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni em 80 kV. As imagens obtidas foram alinhadas e traçadas no programa Reconstruct V1.1.0.0 (Fiala, 2005).

3.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para as técnicas moleculares, as bactérias de interesse foram concentradas como descrito anteriormente, congelados e descongelados antes do uso direto para a amplificação por PCR.

3.8.1 PCR do gene *rrs*

Nas amostras da Lagoa de Araruama e Antártica, o gene que codifica o rRNA 16S foi amplificado utilizando os iniciadores 8bF (5'-GRGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1512uR (5'-ACGGHTACCTTGTTACGACTT-3'); (EDER *et al.* 1999). Cada reação continha 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 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). O ciclo aplicado foi: 1x (5 min, 94°C); 35x (1 min s, 94°C; 1 min, 50°C; 2 min, 72°C); 1x (8 min, 72°C); 4°C.

Nas outras amostras, os iniciadores utilizados foram 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3')

(LANE, 1991) utilizando REDTaq™ (Sigma) como determinado pelo fabricante e 2 a 3 µl da amostra.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% contendo brometo de etídio na concentração final de 0,1 µg/ml a 80V por 30 minutos e visualizados sob luz U.V. em comprimento de onda de 300 nm.

3.8.2 PCR dos genes *ftsZ*, *mreB* e *aprA*

Como não há iniciadores universais para amplificação dos genes que codificam as proteínas de citoesqueleto FtsZ e MreB e a enzima adenosina-5'-fosfato redutase, foram utilizados iniciadores degenerados na PCR. Os iniciadores foram desenhados pelo programa CODEHOP (ROSE, HENIKOFF & HENIKOFF, 2003) baseando-se nas seqüências dessas proteínas em outras bactérias da classe *Deltaproteobacteria*. Para o gene *ftsZ* iniciadores 5'-GCGAAGATCAAGGTCATCGGNGTNGGNGG-3' e 5'-CACATGATCGCCTTGACGTCNGCRAARTC-3' foram utilizados, correspondendo à região 12-208 da proteína. No caso da amplificação do gene *mreB* foram utilizados os iniciadores 5'-GCGATCGACCTGGGCACNGCNAAYAC-3' e 5'-TGCCGGTCACCAGGTCNCKNCCYTT-3', correspondente à região 30-223 da proteína. Para amplificação do gene *aprA* foram utilizados os iniciadores 5'-GGCATCGTCGGCGTCTTYGGNTAYGG-3' e 5'-GGCAGCCGTCGAACTTGAWYTTTAAAYTT-3'.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% contendo brometo de etídio na concentração final de 0,1 µg/ml a 80V por 20 minutos e visualizados sob luz U.V. em comprimento de onda de 300 nm.

3.9 Clonagem e sequenciamento

Os produtos obtidos nas reações acima foram purificados pelo uso do kit PureExtreme™ *DNA Extraction* (Fermentas) e clonados em *Escherichia coli* DH5α, utilizando o *kit* InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) ou o *kit* pGEMT Easy Vector (Promega Corporation, Madison WI), de acordo com o manual do fabricante. Os clones obtidos foram seqüenciados através do serviço de sequenciamento do Instituto de Biofísica Carlos Chagas, UFRJ, ou pela empresa Functional Biosciences Inc., Madison WI.

3.10 Análise filogenética

O alinhamento das seqüências obtidas com outras seqüências de referências foi feito utilizando a ferramenta ClustalW Multiple Alignment no programa Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). As seqüências utilizadas no alinhamento foram obtidas no banco de dados do Ribosomal Database Project (RDP Release 10, Update 12; COLE *et al.*, 2009) ou do National Center for Biotechnology Information. Essas seqüências de referência foram obtidas após busca comparativa usando a ferramenta BLAST-N, no caso do gene *rrs*, e BLAST-X (ALTSCHUL *et al.*, 1990) no casos dos genes que codificam proteínas. Seqüências referência para o gene *rrs* também foram obtidas no Ribosomal Database Project (RDP release 10, update 12). As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Neighbour-Joining (SAITOU & NEI, 1987), usando a máxima verossimilhança composta entre as seqüências como valor de distância no programa MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007).

3.11 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridização *in situ* foi feita de acordo com Pernthaler *et al.* (2001). Sonda específica 5'-CCTTCGCCACAGGCCTTCTA-3' marcada com Alexa594 foi utilizada para HSMV-1. Outra sonda utilizada foi 5'-CCCCTCCTTCTTCCGAAA-3' marcada com Alexa660 para BW-1. Em ambos os casos a sonda universal para eubactérias 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' marcada com Alexa594 foi utilizada. A solução de hibridização continha 10 ng/ml da sonda, 20% formamida para HSMV-1 e 5% para BW-1, 0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM Na₂EDTA and 0,01% dodecil sulfato de sódio. A hibridização foi feita em câmara úmida por 16 horas.

4. Resultados

Com objetivo de tornar o texto coerente e conciso, os resultados foram divididos de acordo com as coletas realizadas.

4.1 Morfologia e filogenia de bactérias magnetotáticas encontradas no Vale da Morte

O Vale da Morte é um parque nacional dos EUA caracterizado por ser uma depressão, uma vez que se encontra a 85,5 m abaixo do nível do mar. Essa região faz parte do deserto de Mojave que ocupa uma grande parte do sudeste e pequenas partes centrais do estado da Califórnia, o sul de Nevada, sudoeste de Utah e noroeste do Arizona nos EUA. A temperatura no Vale da Morte varia de -9 a 57°C durante o ano e o índice pluviométrico da região é de 4 cm ao ano. No dia da coleta, que ocorreu no verão e pela manhã, a temperatura da água nos locais em que foram coletadas amostras variou entre 26º C e 30º C e a salinidade entre 2,8 e 3,0%.

Todas as amostras coletadas em *Bad Water* apresentaram grande quantidade de bastonetes magnetotáticos, que foram denominados BW-1 e BW-2, devido a suas diferenças morfológicas quando observados ao microscópio óptico, e um pequeno espirilo denominado BW-3. O estudo de cada um desses morfotipos isoladamente foi possível, pois, apesar de a coleta ter sido feita no mesmo local, uma pequena variação de metros entre os pontos de coleta já era suficiente para obtenção de amostras ricas em BW-1 ou BW-2. A presença de BW-3 só foi observada na amostra em que BW-1 era encontrado e semanas após a coleta, quando a população de BW-1 já havia quase que desaparecido.

A MET de BW-1 mostrou que estes bastonetes de aproximadamente 2,5 µm de comprimento possuem a maioria dos magnetossomos agrupados em uma região da célula, formando uma cadeia aparentemente desorganizada (Figura 4). Os magnetossomos não apresentam morfologia bem definida, mas parecem ter formato paralelepípedo com bordas arredondadas (Figura 5). A composição dos magnetossomos foi identificada por microscopia de alta resolução (Figura 5 inserto superior) associada ao espectro gerado pela aplicação da transformada de Fourier rápida (Figura 5 inserto inferior) e por EDS. Medidas obtidas a partir do espectro de Fourier (Figura 5 inserto inferior) indicaram que os cristais de BW-1 eram consistentes com o mineral greigita. Além disso, a EDS de um cristal (Figura 6a)

mostrou a presença de enxofre e ferro (Figura 6b), o que não foi detectado no citoplasma (Figura 6c), confirmando o resultado anteriormente descrito.

A análise filogenética baseada no gene *rrs* mostrou que BW-1 pertence a classe *Deltaproteobacteria* (Figura 7), sendo a bactéria cultivada filogeneticamente mais próxima *Desulfobacterium vacuolatum* (93% de similaridade). A identificação dessas bactérias por FISH usando sonda específica foi extremamente trabalhosa, pois nem todos os bastonetes magnetotáticos de idêntica morfologia marcavam com a sonda (Figura 8). Observe na Figura 8a e 8b que existem quatro bastonetes idênticos, estes marcam perfeitamente com a sonda para eubactérias (Figura 8c). No entanto, quando analisados quanto à marcação com a sonda específica, essa só é visível em duas bactérias (Figura 8d). Esse padrão de marcação se repetiu inúmeras vezes e por isso, novos clones contendo as seqüências do gene *rrs* foram seqüenciados. O sequenciamento e alinhamento dessas seqüências mostraram grande diversidade na população de BW-1, especialmente na região em que a sonda foi desenhada. Os valores de similaridade para os clones seqüenciados variaram de 95 a 100%. Além disso, amostras coletadas em outros locais também apresentaram bactérias magnetotáticas semelhantes à BW-1 quanto à morfologia e filogenia, como é o caso de GL-1 encontrada em Gerlach (Figura 7). GL-1 não foi detalhadamente estudado, uma vez que era muito semelhante à BW-1 e que as coletas feitas em Gerlach visavam o estudo de outra bactéria descrita em tópico específico sobre a coleta em Gerlach.

BW-2 foi diferenciado de BW-1 pela observação ao microscópio óptico por ser um bastonete com inúmeros grânulos (Figura 9). A MET de células aderidas à grade revestida com formvar mostrou a presença de uma única cadeia de magnetossomos (Figura 10a), sendo esta organização e a morfologia dos cristais (Figura 10b) indicativa de magnetita. A contrastação negativa dessas células mostrou que elas possuem um tufo de flagelos em um pólo da célula (Figura 11). O comprimento e espessura aproximados dos flagelos são 8,5 μm e 15 nm, respectivamente. A análise da composição dos grânulos por EDS mostra que esses são ricos em fósforo (Figura 12). Já os magnetossomos são provavelmente de magnetita (Figura 13), devido à presença de ferro e oxigênio no cristal analisado e ausência de enxofre. O controle negativo está representado na Figura 14.

A análise filogenética de BW-2 baseada no gene *rrs* mostrou que essa bactéria apresenta 89% de similaridade em relação à *Thioalkalivibrio paradoxus*,

pertencendo à classe *Gammaproteobacteria* (Figura 15). Não foi possível fazer FISH de BW-2 devido à escassez de amostra contendo a bactéria e de tempo. No entanto, foi possível o isolamento de BW-2 em cultura pura por Christopher Lefevre na mesma ocasião em que as análises descritas acima foram feitas. A amplificação e sequenciamento do gene *rrs* confirmou que BW-2 era a bactéria isolada no meio de cultura, assim como a MET confirmou a morfologia da célula e dos magnetossomos. Essa é a primeira descrição de bactéria magnetotática pertencente à classe *Gammaproteobacteria*.

A bactéria BW-3 foi identificada como um pequeno espirilo morfologicamente e filogeneticamente semelhante à MMS-1 (AMANN, PEPLIES & SCHÜLER, 2007) e por isso não foi detalhadamente estudada (dados não mostrados).

Figura 4 Microscopia eletrônica de transmissão de BW-1 mostrando a organização dos magnetossomos em uma cadeia múltipla desorganizada. A barra de escala indica 200 nm.

Figura 5 Micrografia eletrônica de transmissão dos magnetossomos de BW-1 em maior aumento, mostrando sua forma irregular. Inseto superior mostra a microscopia de alta resolução de um cristal magnético de BW-1. Inseto inferior representa o espectro gerado pela aplicação da transformada de Fourier rápida na imagem de alta resolução do inseto superior. A barra de escala indica 50 nm na figura e 5 nm no inseto superior.

Figura 6 Espectroscopia de energia dispersiva de raio-X dos magnetossomos de BW-1. (a) Microscopia eletrônica de transmissão no modo varredura de BW-1 mostrando os pontos em que foram feitas as análises de elementos; (b) o espectro do ponto 1 mostra a presença dos elementos ferro e enxofre nos magnetossomos e ausência de oxigênio; (c) espectro do ponto 2, não mostra a presença de ferro e enxofre no citoplasma, sendo esse o controle negativo. A barra de escala indica 200 nm em (a).

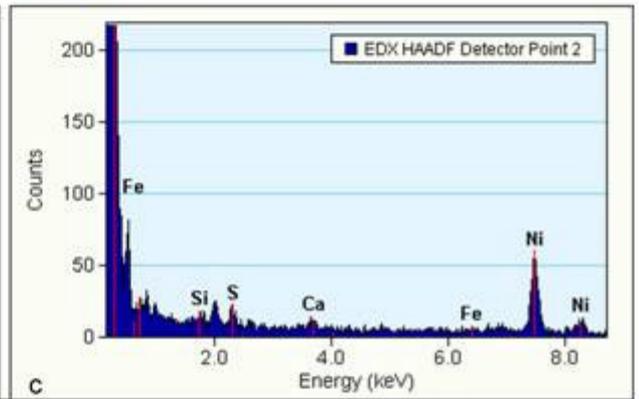
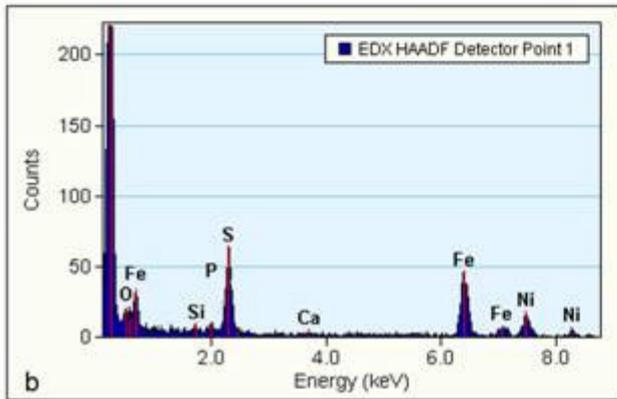
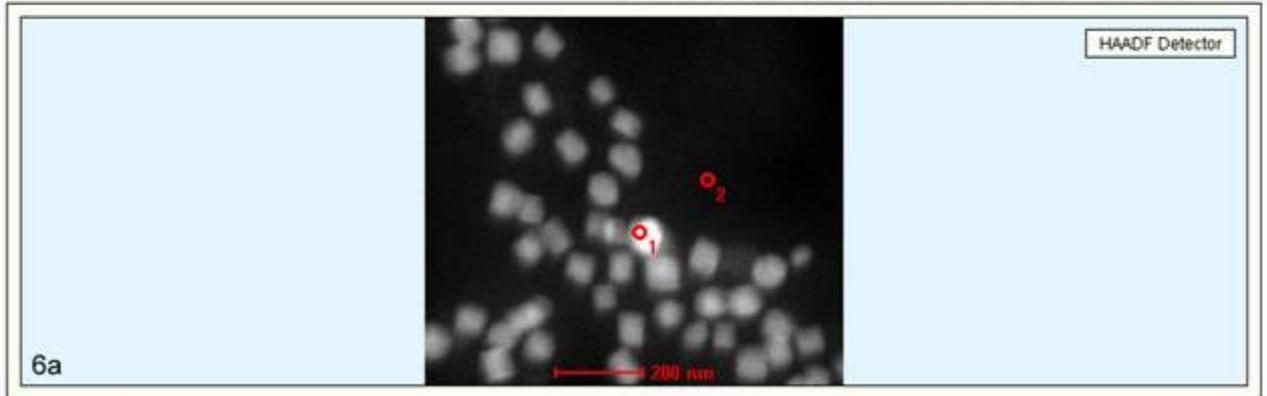
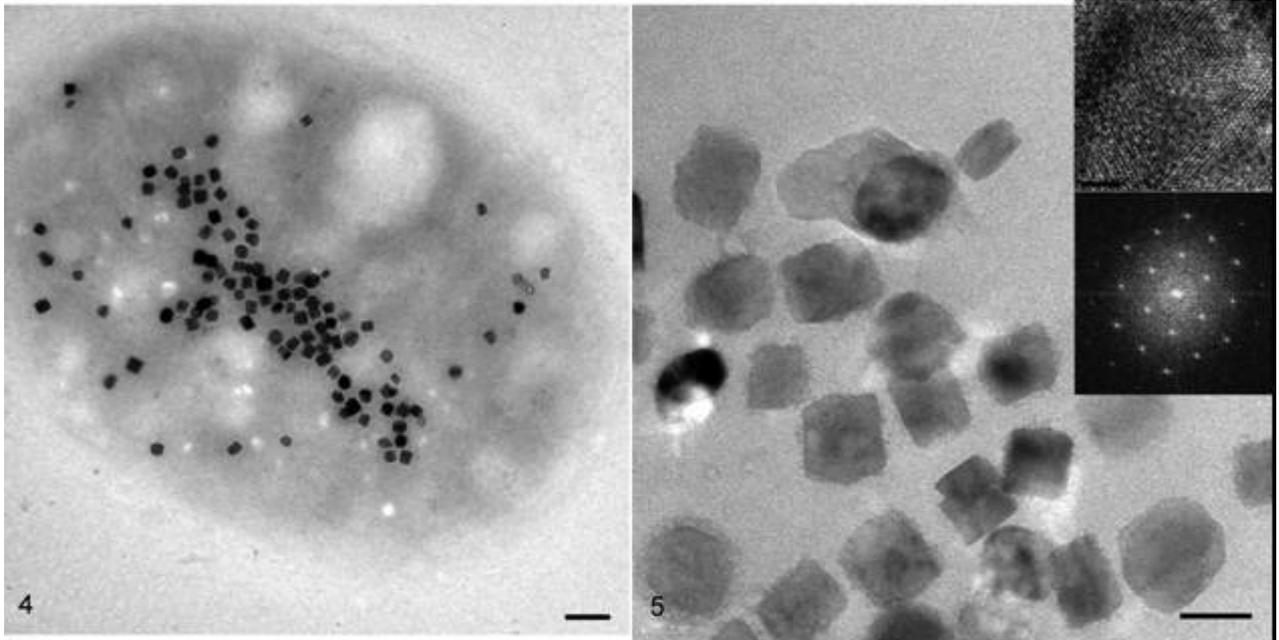


Figura 7 Árvore filogenética da bactéria BW-1 baseada no gene *rrs* construída através do método de Neighbour-Joining, mostrando que esta pertence a classe *Deltaproteobacteria*. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 réplicas. A barra indica 2% de divergência.

Figura 8 FISH em amostras contendo BW-1 usando sonda específica para sua identificação; (a) Micrografia de contraste interferencial diferencial de Nomarski da amostra obtida após concentração magnética; (b) Micrografia de fluorescência da mesma região mostrada anteriormente, usando filtro para DAPI; (c) Micrografia de fluorescência mostrando a marcação específica de eubactérias; (d) Micrografia de fluorescência em que a marcação com sonda específica para BW-1 é utilizada. A barra de escala indica 10 μm .

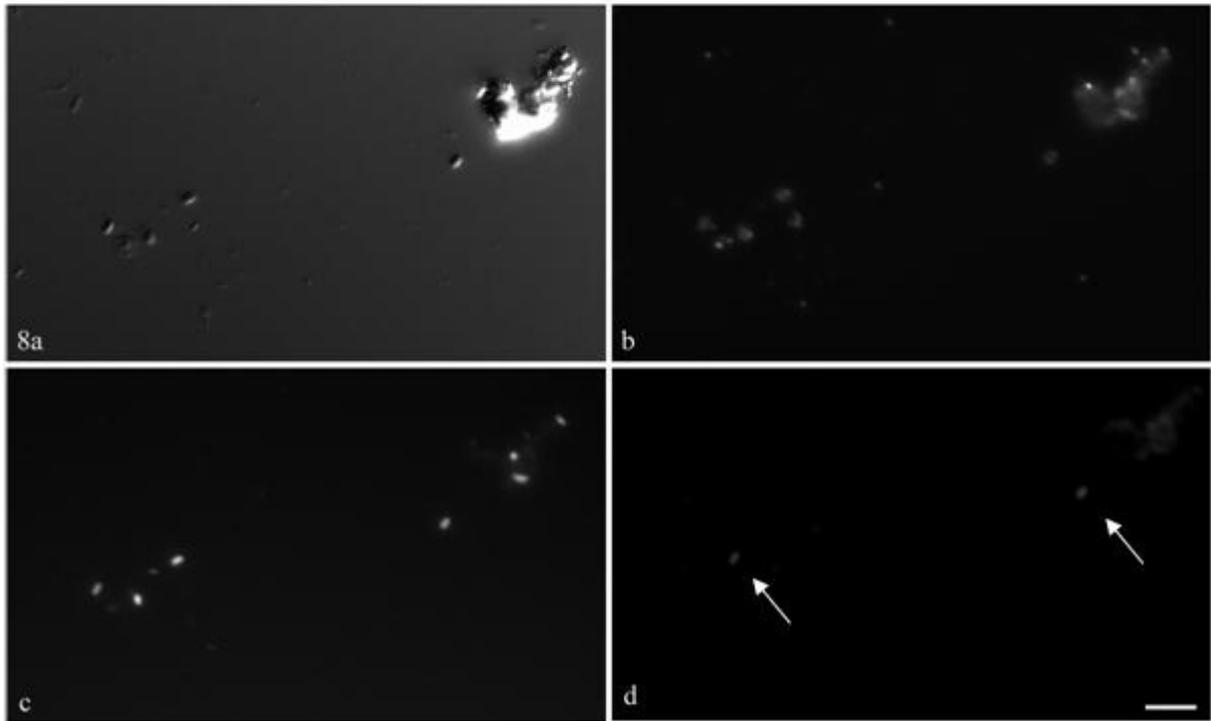
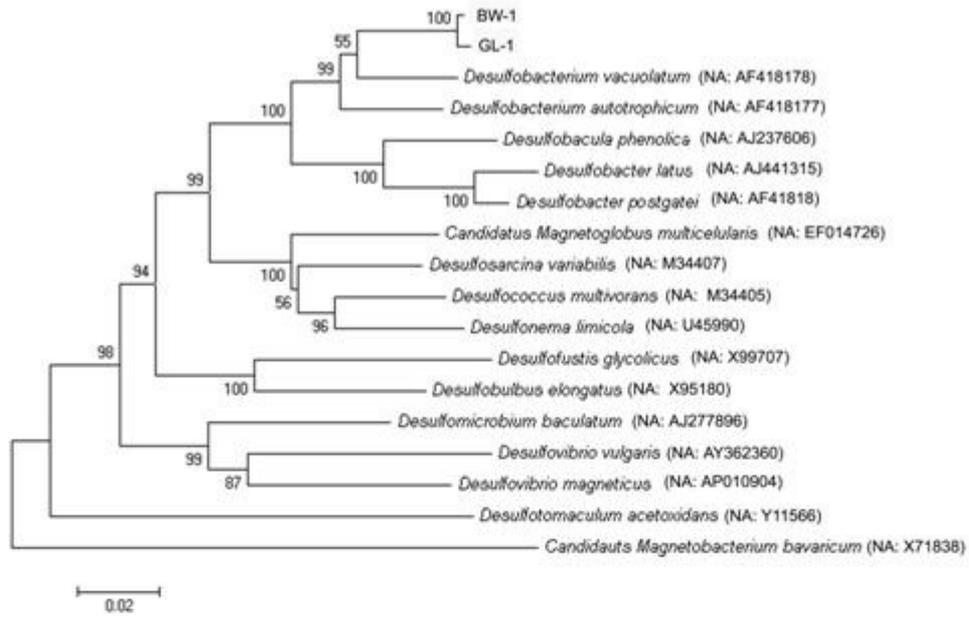


Figura 9 Micrografia de contraste interferencial de Nomarski de amostras de BW-2 obtidas após a concentração magnética. A barra de escala indica 10 μm .

Figura 10 Microscopia eletrônica de transmissão de BW-2 (a) mostrando a existência de uma cadeia de magnetossomos na célula e (b) os magnetossomos dessa célula em maior aumento. A barra de escala indica 200 nm em (a) e 50 nm em (b).

Figura 11 Contrastação negativa de BW-2 mostrando (a) a disposição polar de um tufo de flagelos na célula e (b) os flagelos em maior aumento. A barra de escala indica 1 μm em (a) e 200 nm em (b).

Figura 12 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X dos grânulos de BW-2. (a) Microscopia eletrônica de transmissão no modo varredura de BW-2 mostrando os pontos em que foram feitas as análises de elementos; (b) o espectro do ponto 1 mostra a presença dos elementos fósforo e oxigênio no grânulo; (c) espectro do ponto 2, não mostra evidência a presença dos elementos acima citados no citoplasma, sendo esse o controle negativo. A barra de escala indica 500 nm em (a).

Figura 9 Micrografia de contraste interferencial de Nomarski de amostras de BW-2 obtidas após a concentração magnética. A barra de escala indica 10 μm .

Figura 10 Microscopia eletrônica de transmissão de BW-2 (a) mostrando a existência de uma cadeia de magnetossomos na célula e (b) os magnetossomos dessa célula em maior aumento. A barra de escala indica 200 nm em (a) e 50 nm em (b).

Figura 11 Contrastação negativa de BW-2 mostrando (a) a disposição dos flagelos em um tufo polar na célula e (b) os flagelos em maior aumento. A barra de escala indica 1 μm em (a) e 200 nm em (b).

Figura 12 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X dos grânulos de BW-2. (a) Microscopia eletrônica de transmissão no modo varredura de BW-2 mostrando os pontos em que foram feitas as análises de elementos; (b) o espectro do ponto 1 mostra a presença dos elementos fósforo e oxigênio no grânulo; (c) espectro do ponto 2, não mostra evidência da presença dos elementos acima citados no citoplasma, sendo esse o controle negativo. A barra de escala indica 500 nm em (a).

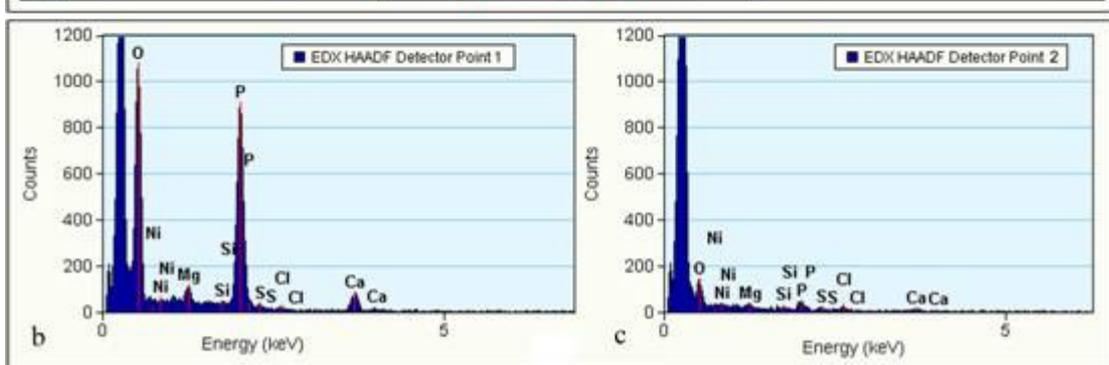
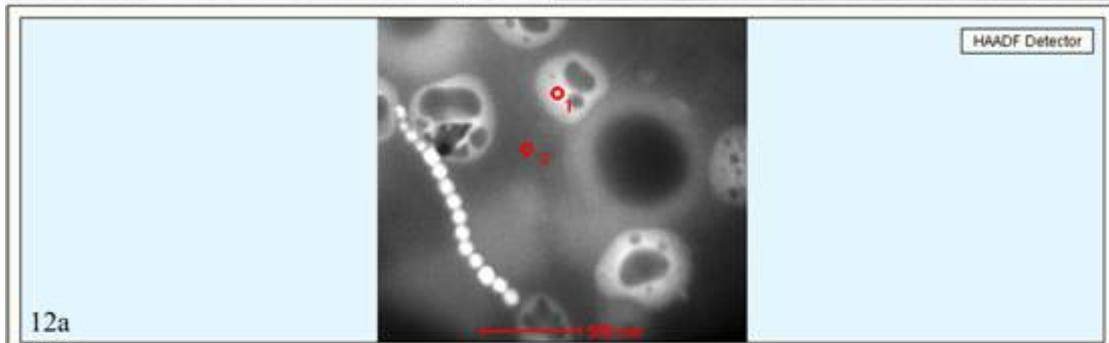
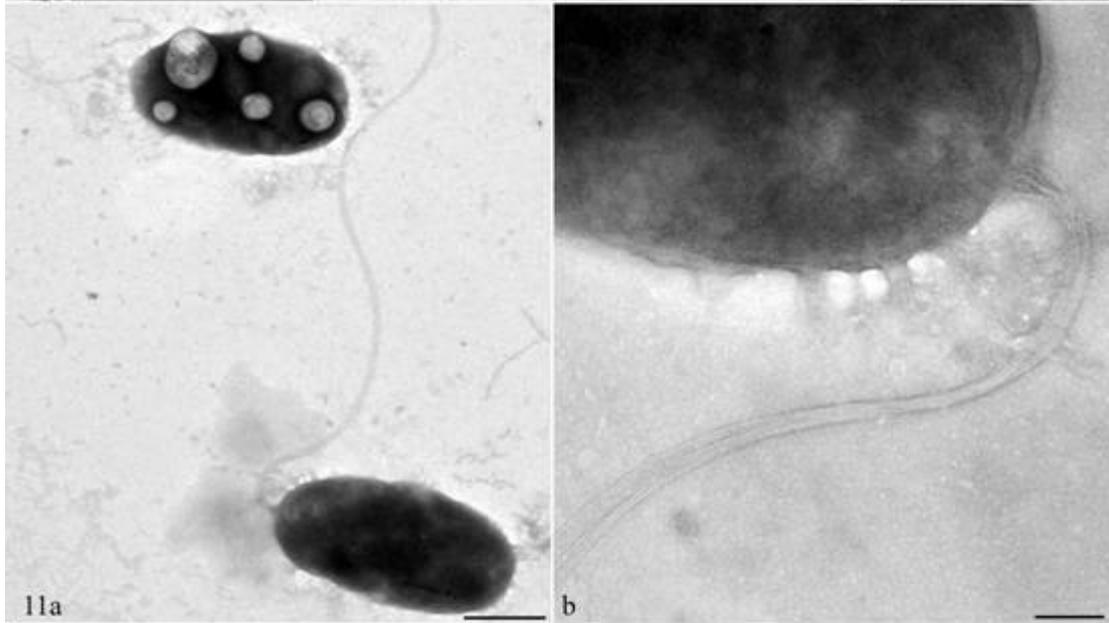
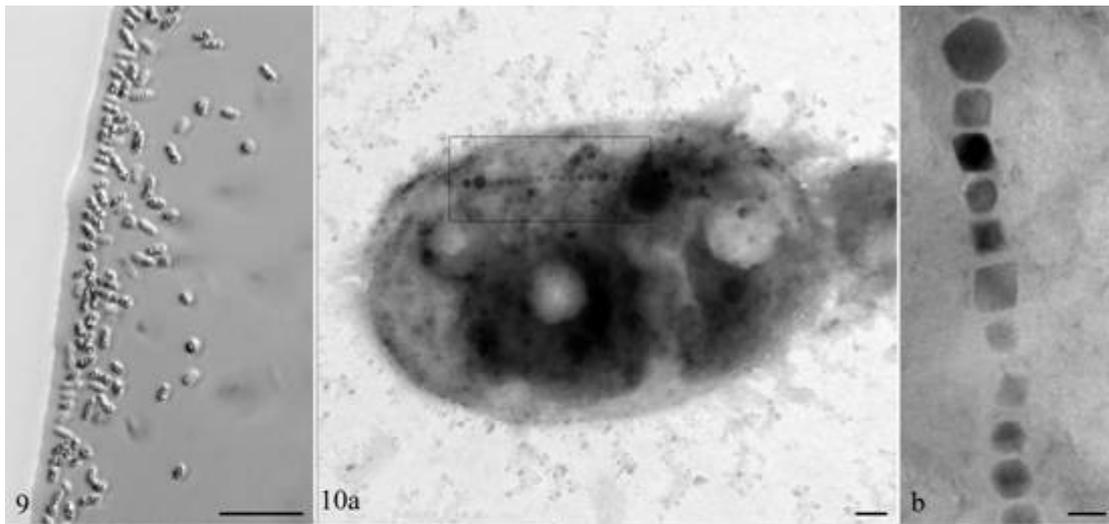
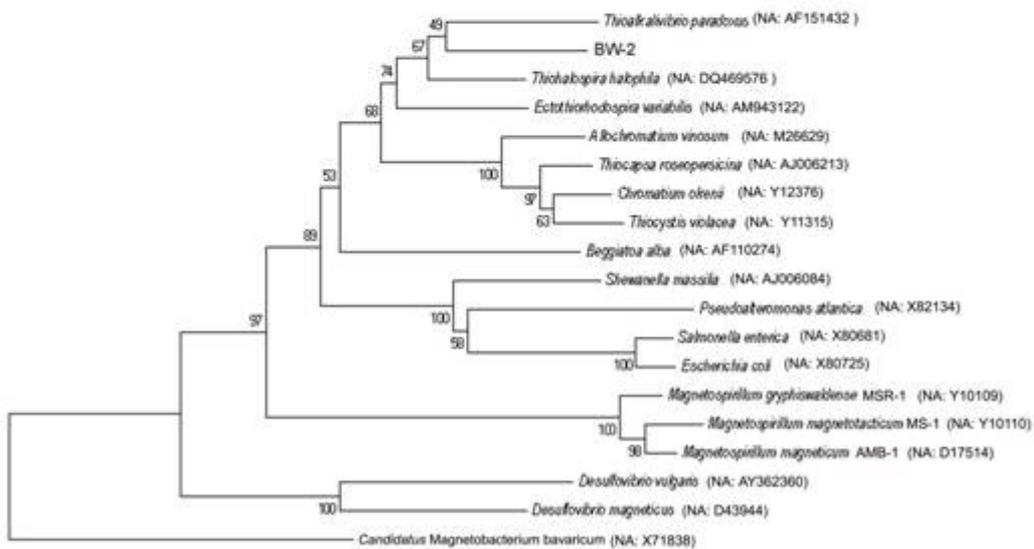
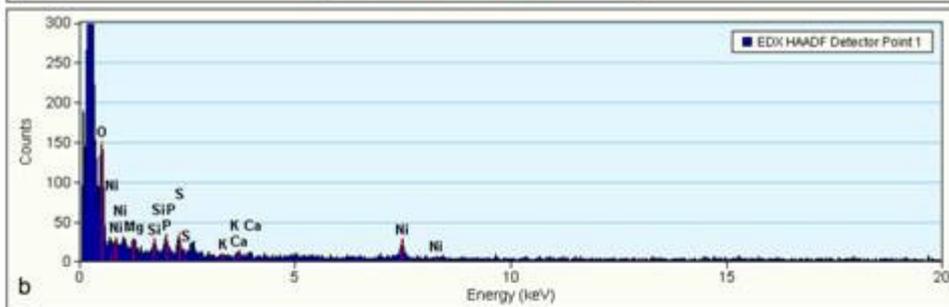
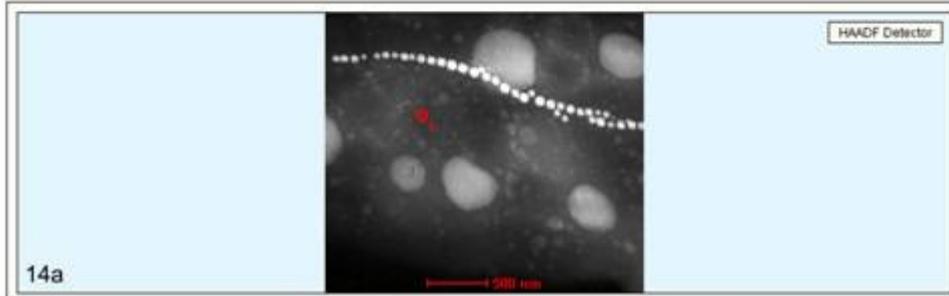
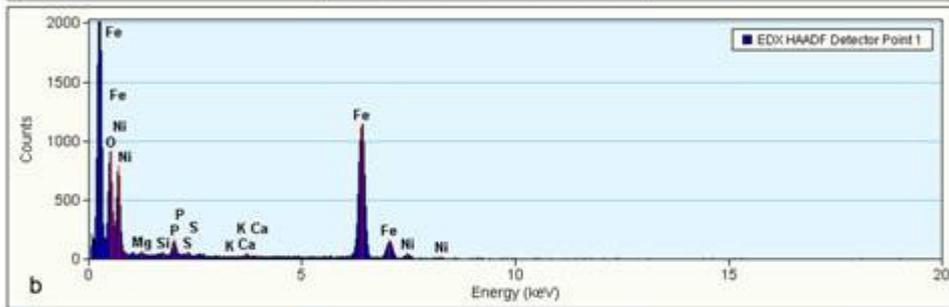
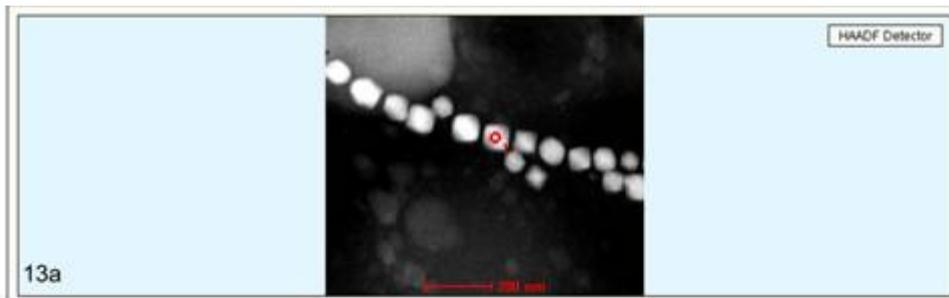


Figura 13 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X dos magnetossomos de BW-2. (a) Microscopia eletrônica de transmissão-varredura de BW-2 mostrando o ponto da célula que foi analisado; (b) espectro obtido mostra a presença de ferro e oxigênio no magnetossomo e ausência de enxofre. A barra de escala indica 200 nm em (a).

Figura 14 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X de BW-2. (a) Microscopia eletrônica de transmissão-varredura de BW-2 mostrando o ponto do citoplasma que será analisado; (b) espectro que mostra a inexistência de ferro e oxigênio nessa região da célula. A barra de escala indica 500 nm em (a).

Figura 15 Árvore filogenética da bactéria BW-2 baseada no gene *rrs* construída por Neighbour-Joining, mostrando que esta pertence à classe *Gammaproteobacteria*. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 replicas. A barra indica 2% de divergência.



4.2 Morfologia e filogenia de bactérias encontradas em fontes termais de *Gerlach* e *Pyramid Lake*

Amostras de fontes termais do deserto Black rock foram obtidas em uma cidade denominada Gerlach. As amostras foram coletadas em um complexo de fontes termais denominado *Great Boiling Springs*. A temperatura das fontes varia entre a temperatura ambiente até 100° C. Em fontes com a temperatura variando de 32 a 63° C e salinidade de 0,4% foi encontrado um pequeno vibrião magnetotático denominado HSMV-1 (*hot spring magnetic vibrio*). A presença dessa bactéria não foi observada em fontes cuja temperatura era igual ou superior a 67° C.

A observação de amostras de HSMV-1 ao MET mostrou que cada célula possui uma única cadeia de magnetossomos com cristais em forma de ponta de lança (Figura 16a e 16b). As medidas feitas a partir da difração de elétrons de área selecionada (Figura 16b; inserto superior) e o mapeamento dos elementos ferro (Figura 17a), oxigênio (Figura 17b) e enxofre (Figura 17c) na amostra mostraram que os magnetossomos são formados por magnetita.

Através da amplificação e seqüenciamento do gene *rrs* de HSMV-1 foi possível classificar a bactéria como pertencente ao filo *Nitrospira* (Figura 18), sendo seu semelhante mais próximo *Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus* (87% de similaridade). As bactérias magnetotáticas pertencentes ao filo *Nitrospira*, “*Ca. M. bavaricum*” e MHB-1, apresentam 86,4 e 86,5% de similaridade em relação ao gene *rrs* respectivamente. Uma sonda específica foi desenhada para HSMV-1 e a FISH mostrou que essa marcou apenas as células de HSMV-1, indicando que a seqüência obtida é realmente proveniente da bactéria magnetotática estudada (Figura 19).

Outros morfotipos de bactérias magnetotáticas foram encontrados em fontes termais dessa área, dentre eles outros vibriões de maior tamanho, espirilos e cocos. No entanto, essas fontes possuíam temperaturas próximas a temperatura ambiente na ocasião da coleta, o que desmotivou seu estudo frente ao estudo de HSMV-1.

Surpreendentemente, as amostras coletadas em fontes com temperaturas próximas a do ambiente em *Great Boiling Springs* apresentaram um tipo morfológico idêntico aos MMPs que não respondiam ao campo magnético, denominado nMMP. Esse tipo morfológico também foi encontrado no *Pyramid Lake*, cuja salinidade é de 0,6%. Por ser semelhante ao morfotipo mais interessante de bactéria magnetotática, o estudo dos nMMPs foi desenvolvido a fim de definir a relação filogenética entre

eles e os MMPs e identificar ou não a presença de magnetossomos nessas células.

O estudo das bactérias magnetotáticas é muito facilitado por elas responderem ao campo magnético, o que permite seu enriquecimento. No caso dos nMMPs, não foi possível seu enriquecimento através do campo magnético. A partir da observação de amostras contendo esses microrganismos foi notada uma resposta negativa a luz (Vídeo 1). Assim, uma forma de concentração de microrganismos que usa luz intensa foi desenvolvida para tornar possível seu estudo. A Figura 20 mostra como foi feito o enriquecimento da amostra que permitiu a preparação de amostras.

Inicialmente, sedimento e água da amostra foram retirados da amostra pelo uso de uma pipeta Pasteur descartável de 3 ml e transferidos para tubo de polipropileno de 2 ml até completar esse volume. Esse tubo foi invertido algumas vezes e a cada vez era retirada água da superfície evitando o sedimento. Esse processo foi repetido várias vezes até que se obteve 2 ml de amostra quase sem sedimento. Pipetas Pasteur de vidro com a ponta selada e com filtro de algodão foram autoclavadas e tiveram sua extremidade capilar preenchida com água da amostra filtrada em filtro 0,22 μm . A mesma quantidade de amostra foi adicionada em duas pipetas Pasteur preparadas como descrito. Uma das pipetas ficou exposta à luz intensa por 40 minutos com a extremidade capilar coberta, enquanto que a outra ficou protegida da luz (Figura 20). Após esse período as extremidades foram quebradas e o líquido do interior retirado com auxílio de uma seringa.

Para verificar se o sistema de enriquecimento usando a luz funcionava eficientemente, foram feitas contagens do número de nMMPs em 5 μl da amostra antes da concentração, depois da concentração e na amostra que ficou protegida da luz (Figura 21). Essas contagens foram feitas cinco vezes para cada local de coleta. Os valores encontrados nas contagens antes da concentração não estão no gráfico, pois eram apenas usados para verificar a presença do microrganismo na amostra a ser usada no processo. Os resultados mostram que realmente os nMMPs apresentam uma resposta fototática negativa em relação a luz e puderam ser concentrados, o que permitiu seu estudo.

A resposta dos nMMPs a diferentes comprimentos de onda foi avaliada pela observação ao microscópio óptico. Após a concentração, uma gota de 5 μl contendo os microrganismos foi observada ao microscópio óptico usando filtros específicos para diferentes comprimentos de onda de forma que apenas uma das bordas da

gota era diretamente iluminada com a luz. Cinco contagens foram feitas usando a mesma gota para uma série de contagens com filtros para luz de 640/20, 530/20, 480/20, 435/20 nm e luz branca, de forma que os mesmos microrganismos eram avaliados para cada condição. Após 3 minutos o número de microrganismos na borda inversa da gota era contado. Também era observada se havia ou não a presença de microrganismos na borda iluminada ao final dos 3 minutos, o que nunca foi observado. A Figura 22 mostra a contagem realizada, sugerindo os microrganismos só apresentavam fototaxia negativa quando expostos à luz branca, azul e púrpura. Quando a gota era iluminada com luz de comprimentos de onda de 530 e 640 nm os microrganismos eram encontrados nadando no centro da gota.

A observação dos nMMPs ao microscópio óptico mostrou que eles são muito semelhantes aos MMPs (Figura 23 e 24a-c) e possuem similar movimento livre (Vídeo2). As células do nMMPs também sofrem desagregação característica dos MMPs (Figura 24b e c), mas essa acontece ao longo do tempo de observação e é muito menos freqüente, o que sugere que por algum motivo esses microrganismos não magnéticos sejam mais resistentes do que os MMPs.

A MET mostrou que, de fato, os nMMPs não possuem magnetossomos (Figuras 25 e 26) e que suas células possuem flagelos apenas na região em contato com o exterior, o que faz com que o microrganismo como um todo apresente flagelação peritríquea, como observado para os MMPs (Figura 26).

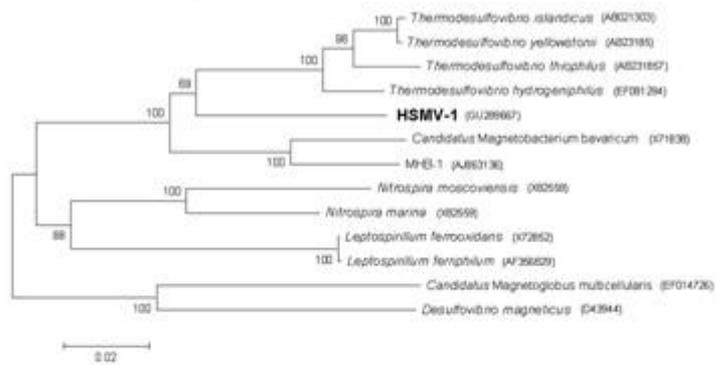
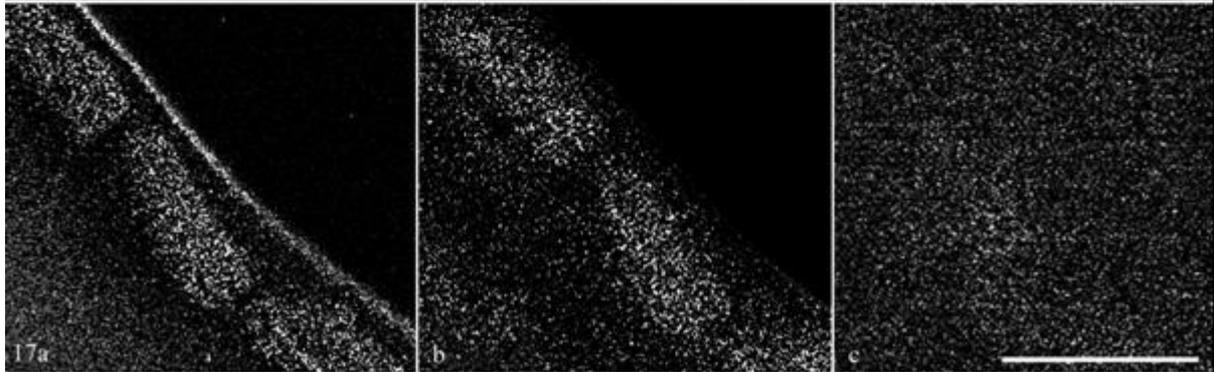
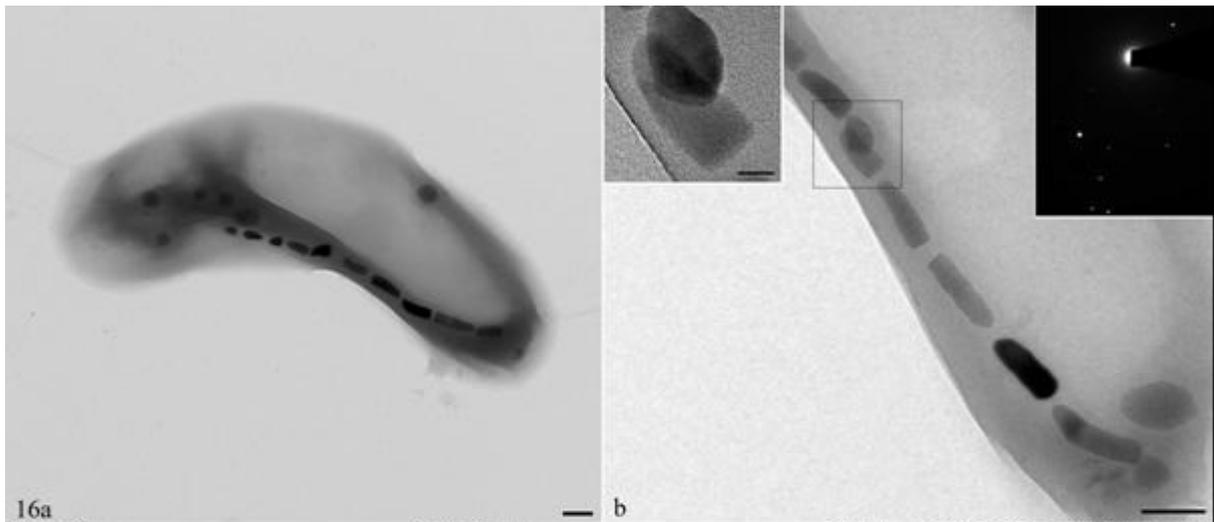
A análise filogenética baseada no gene *rrs* desses microrganismos mostrou que eles pertencem à classe *Deltaproteobacteria* e se agrupam em um ramo exclusivo no grupo de MMPs (Figura 27).

Figura 16 Micrografia eletrônica de transmissão da bactéria HSMV-1 mostrando (a) a forma da célula e a cadeia única de magnetossomos; (b) maior aumento da cadeia de magnetossomos; inserto superior esquerdo é o maior aumento da região em que foi feita a difração área selecionada; inserto superior direito mostra a difração de área selecionada do magnetossomo. A barra de escala indica 500 nm em (a), 200 nm em (b) e 50 nm no inserto superior direito.

Figura 17 Mapa dos elementos obtido através da espectroscopia de elétrons por perda de energia (a) ferro; (b) oxigênio e (c) enxofre em magnetossomos de HSMV-1. A barra de escala indica 100 nm para todas as figuras.

Figura 18 Árvore filogenética de HSMV-1 baseada no gene *rrs* construída por Neighbour-Joining, mostrando que esta pertence ao filo *Nitrospira*. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 réplicas. A barra indica 2% de divergência.

Figura 19 FISH em amostras contendo HSMV-1 usando sonda específica para sua identificação; (a) Micrografia de contraste interferencial diferencial de Nomarski da amostra obtida após concentração magnética; (b) Micrografia de fluorescência mostrando a marcação com DAPI; (d) Micrografia de fluorescência em que a marcação com sonda específica para HSMV-1 é utilizada. Note que as setas mostram outras bactérias que não foram marcadas com sonda a sonda específica, sendo, então o controle negativo. A barra de escala indica 5 μ m.



18

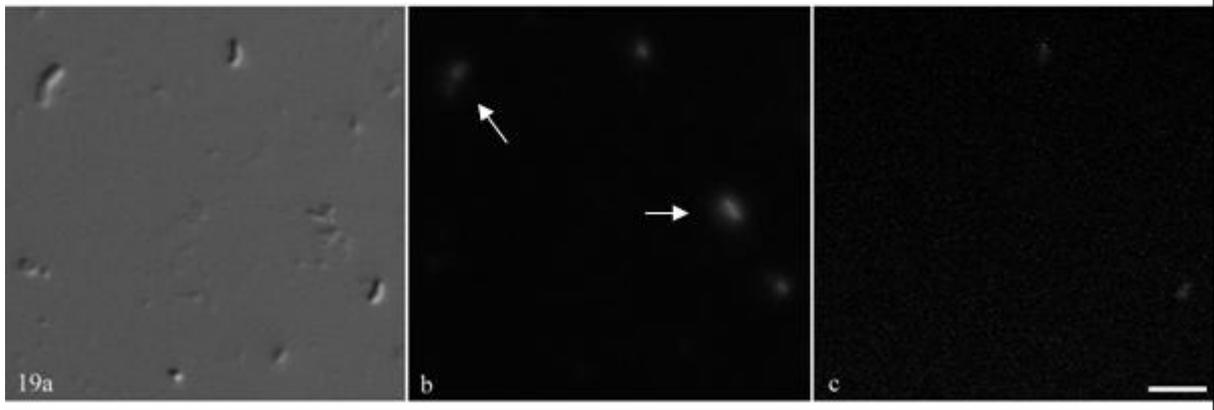


Figura 20 Sistema utilizado para enriquecer a amostra ambiental contendo nMMPs usando a luz. A pipeta da direita, em que não há luz, foi um controle negativo utilizado para verificar se o método de concentração funcionava. A barra de escala indica 8 cm.

Figura 21 Contagem de nMMPS em amostras de Gerlach (A,B) e *Pyramid Lake* (C,D) após concentração usando a luz. B e D representam os controles.

Figura 22 Contagem de nMMPS após concentração com a luz de diferentes comprimentos de onda feita no microscópio óptico.

Figura 23 Micrografia de contraste interferencial de Nomarski de nMMPs obtidos após concentração com a luz. A barra de escala indica 10 μm .

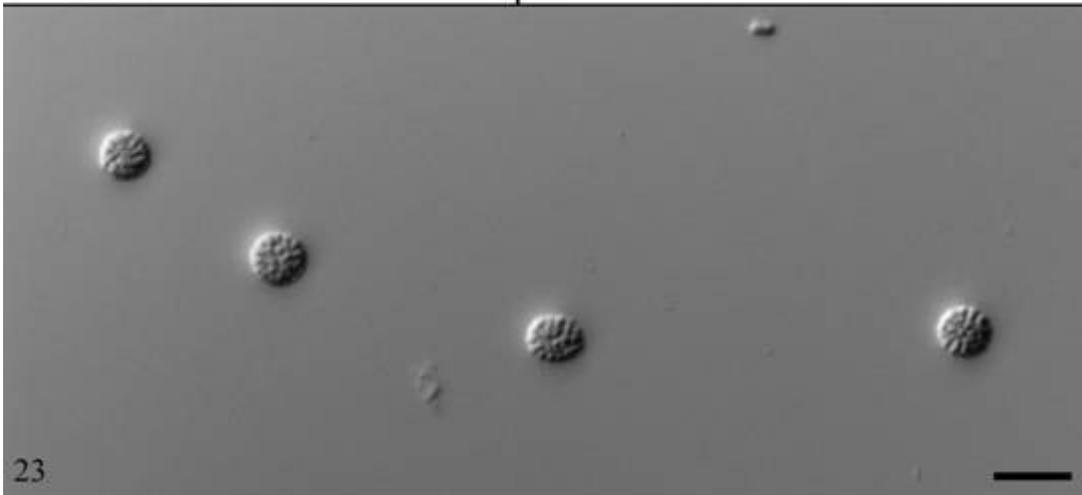
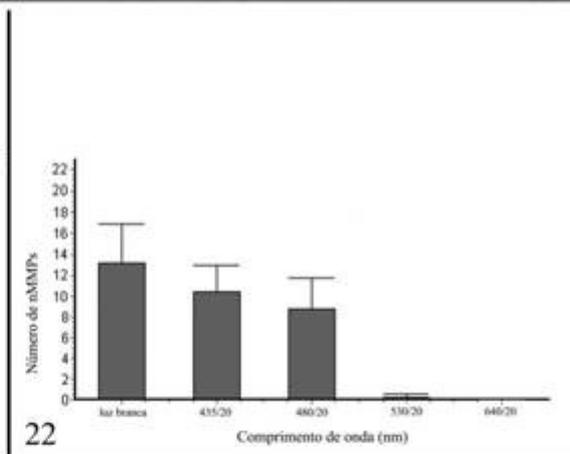
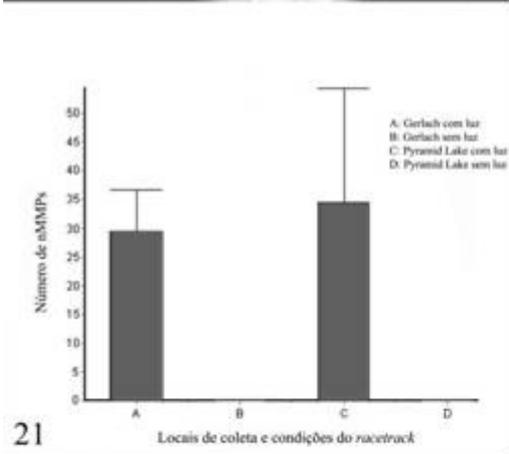
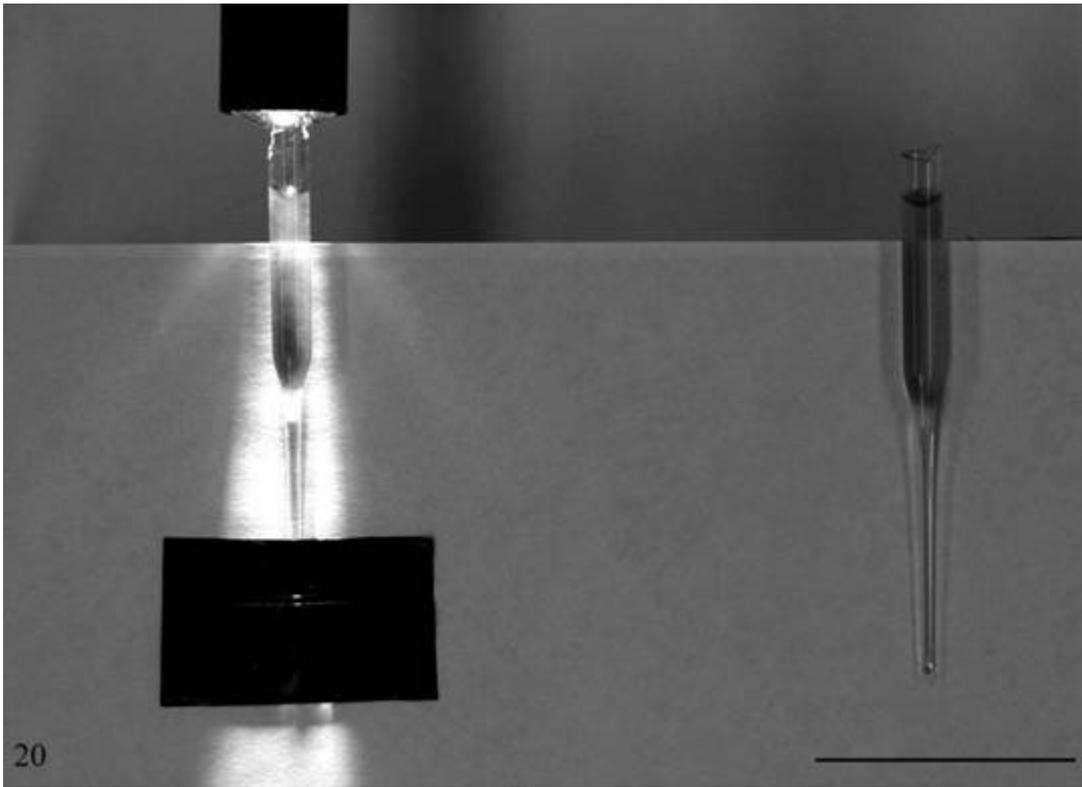
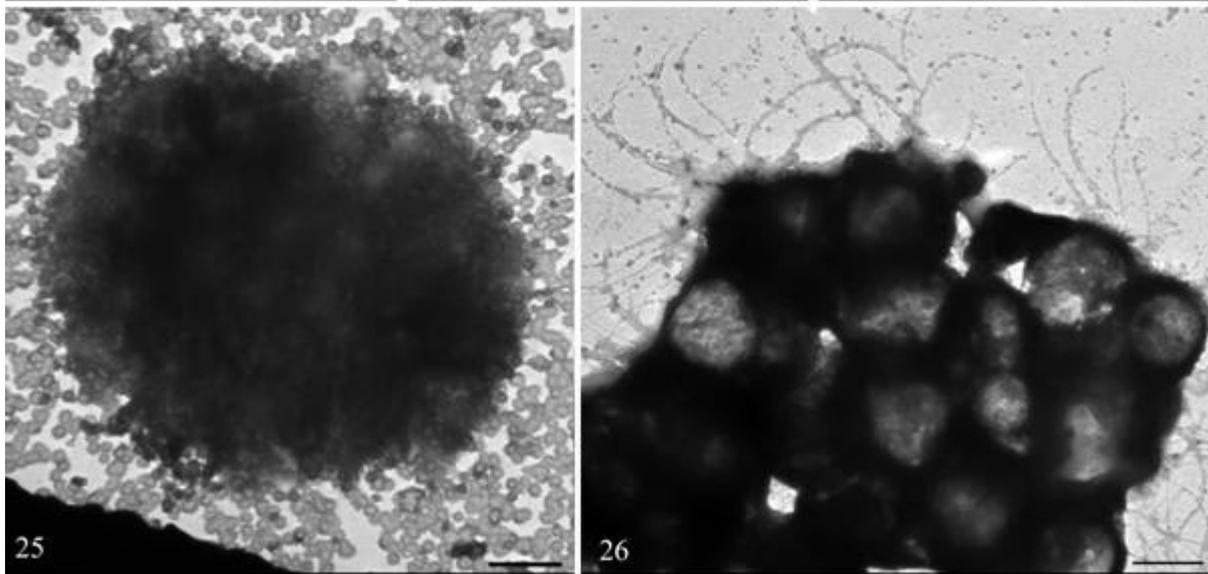
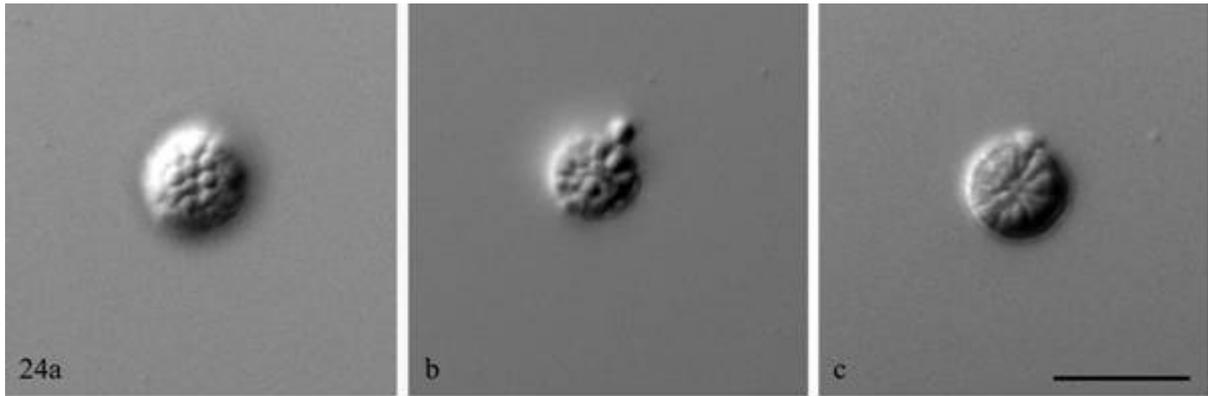


Figura 24 Micrografia de contraste interferencial de Nomarski de nMMPs encontrados em diferentes locais após concentração com a luz. Esse microrganismos foram encontrados em (a) Gerlach fonte 5, (b) Gerlach fonte 8 e Pyramid Lake. A barra de escala indica 10 μm .

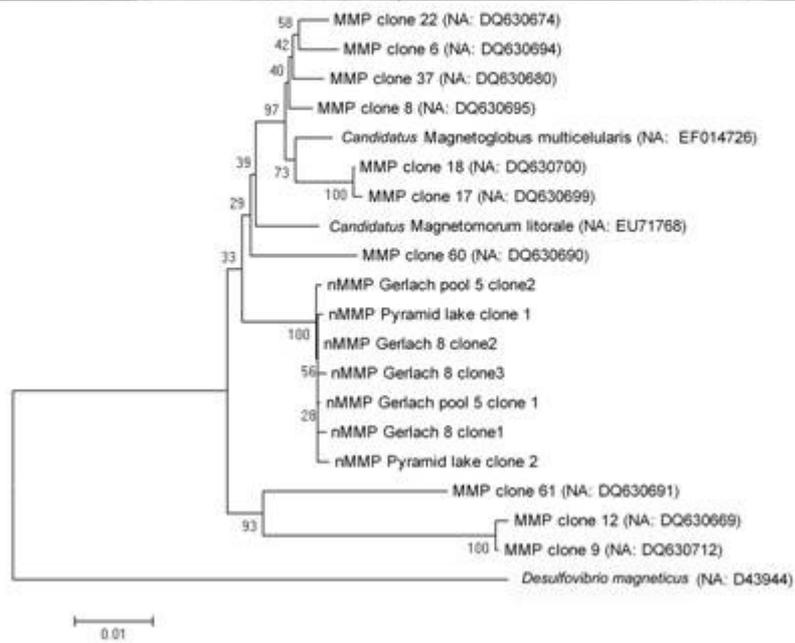
Figura 25 Micrografia eletrônica de transmissão de nMMP encontrado em Gerlach fonte 5 mostrando a inexistência de cristais em suas células. A barra de escala indica 1 μm .

Figura 26 Micrografia eletrônica de transmissão de células desagregadas do nMMP mostrando flagelos na superfície das células e a ausência de magnetossomos. A barra de escala indica 1 μm .

Figura 27 Árvore filogenética de nMMPs de Gerlach e do *Pyramid Lake* baseada no gene *rrs*, mostrando que esta pertence a classe *Deltaproteobacteria*, assim como outros os procariotos multicelulares magnetotáticos. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 replicas. A barra indica 1% de divergência.



27



4.3 Morfologia e filogenia de procariotos multicelulares magnetotáticos encontrados em *Salton Sea*

As amostras do deserto do Colorado foram coletadas em uma lagoa denominada *Salton Sea*. A salinidade nas amostras coletadas variou de 4,4 a 4,8%. Diversos locais de coleta foram avaliados e a diversidade de microrganismos magnetotáticos encontrada foi muito grande, incluindo cocos, bastonetes, *barbell* e a forma multicelular. O estudo dos MMPs foi o que mais se destacou devido ao seu grande número na maioria dos pontos de coleta.

A observação dos MMPs ao microscópio óptico mostrou que estes são muito semelhantes a "*Ca. M. multicellularis*", sendo possível a observação do compartimento interno em alguns microrganismos (Figura 28, seta). Os MMPs encontrados nas amostras possuem uma grande variação de tamanho, assim como os que habitam a Lagoa de Araruama. Quando acumulados na borda da gota apresentam os movimentos de rotação e *ping-pong* (Vídeo 3). Não foram observadas formas similares às descritas no ciclo de vida exclusivamente multicelular de "*Ca. M. multicellularis*".

A MET mostrou que as células possuem flagelos em sua porção em contato com o ambiente (Figura 29) e que os magnetossomos estão organizados em cadeias como observado em "*Ca. M. multicellularis*" (Figura 30). As células possuem magnetossomos irregulares de 69 ± 14 nm por 56 ± 11 nm (n=110). Ainda não foi possível identificar o mineral que forma o magnetossomo nessa amostra, mas devido a sua morfologia acredita-se que esse seja greigita (Figura 31).

A análise filogenética baseada no gene que codifica o rRNA 16S mostrou que eles pertencem a *Deltaproteobacteria*, tendo ampla distribuição no grupo dos MMPs (Figura 32).

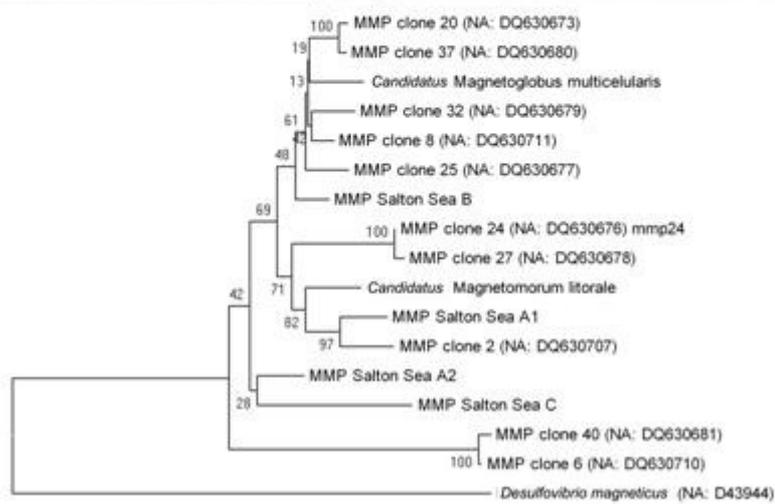
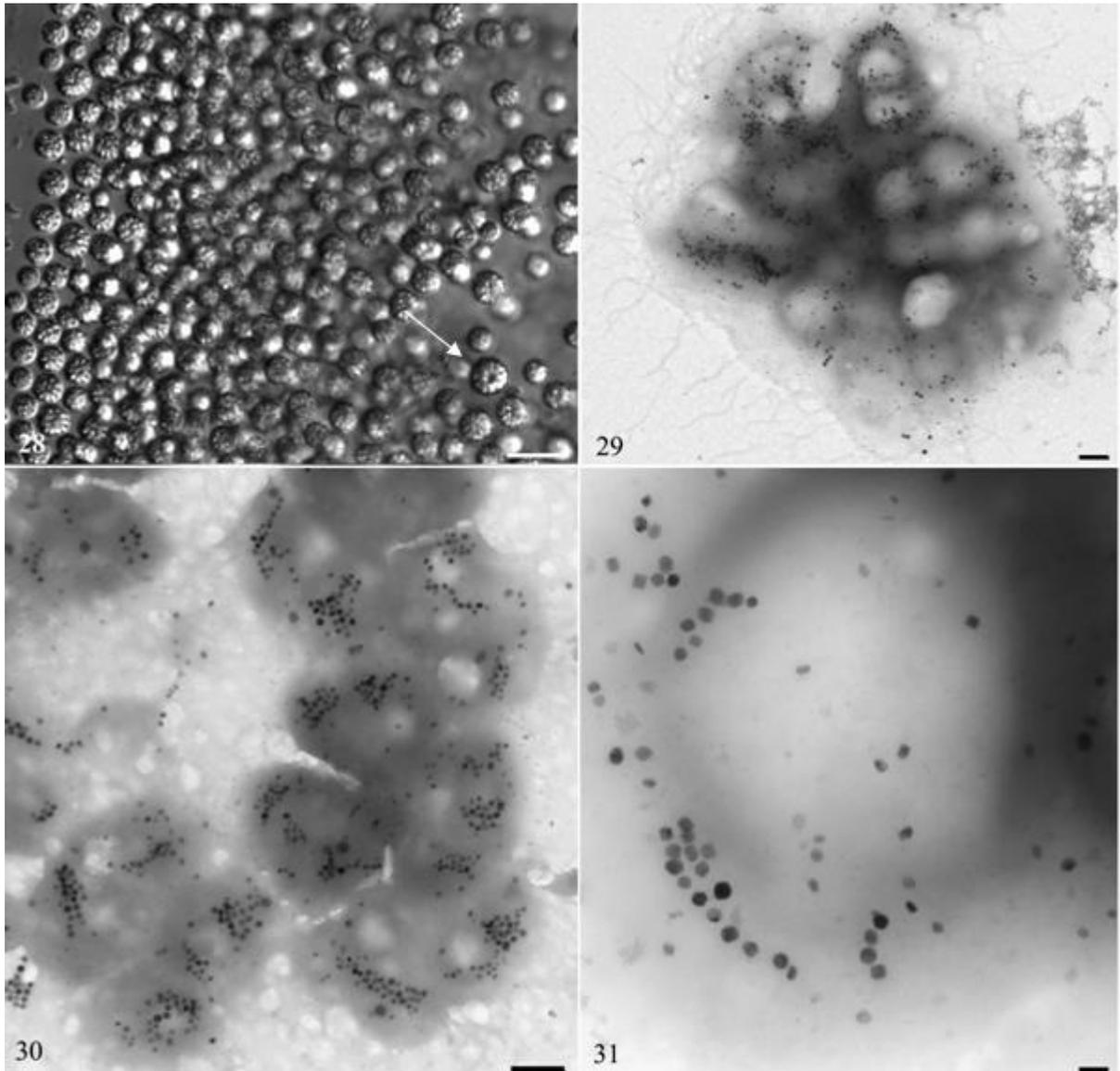
Figura 28 Micrografia de contraste interferencial de Nomarski de MMPs encontrados em Salton Sea. A barra de escala indica 10 μm .

Figura 29 Micrografia eletrônica de transmissão de MMP coletado em Salton Sea mostrando a distribuição dos flagelos na superfície das células. A barra de escala indica 500 nm.

Figura 30 Micrografia eletrônica de transmissão mostrando células desagregadas de MMPs coletados em Salton Sea. A barra de escala indica 500 nm.

Figura 31 Micrografia eletrônica de transmissão mostrando o formato irregular característico de magnetossomos de MMPs. A barra de escala indica 100 nm.

Figura 32 Árvore filogenética baseada no gene *rrs* dos MMPs encontrados em Salton Sea, mostrando sua posição na classe *Deltaproteobacteria*, assim como outros procariotos multicelulares magnetotáticos. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 réplicas. A barra indica 2% de divergência.



4.4 Morfologia de bactérias magnetotáticas encontradas na Antártica

A Antártica é um continente frio e seco localizado no extremo sul da Terra. As amostras estudadas nesse projeto foram coletadas em ambiente costeiro no qual a temperatura média durante o verão chega a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras de sedimento marinho foram coletadas a 8 metros de profundidade através do uso do amostrador de Van Veen.

A observação das amostras de Pulta Ullman revelou a presença de três morfotipos distintos de cocos magnetotáticos que puderam ser diferenciados pela organização dos magnetossomos na célula (Figura 33, 34 35). O tipo mais abundante na amostra era o coco com duas cadeias de magnetossomos, sendo este seguido pelo com as cadeias desorganizadas e finalmente pelo que apresentava quatro cadeias.

Nos cocos que possuíam duas cadeias de magnetossomos, o número de cristais na célula variou de 10 a 26, sendo a média 16 ± 5 . O número médio de magnetossomos em cada célula nos cocos com quatro cadeias de magnetossomos foi de 38 ± 9 , sendo 30 e 48 o menor e maior número de cristais encontrados. No caso dos cocos contendo cadeias de magnetossomos desorganizadas, o número de magnetossomos variou de 16 a 26, sendo a média 22 ± 3 . O número de cristais encontrado em cada cadeia da mesma célula era o mesmo na maioria dos casos nos cocos de duas e quatro cadeias.

A análise estatística mostrou que o tamanho médio dos cristais é de 112 ± 35 por 68 ± 20 nm, 97 ± 21 por 67 ± 17 nm e 83 ± 13 por 46 ± 7 nm para as bactérias que possuem duas cadeias de magnetossomos, para as que possuem quatro e para as que possuem magnetossomos desorganizados, respectivamente. Os valores encontrados para os diâmetros máximo e mínimo e para o fator de forma estão descritos na Tabela 1.

A distribuição dos valores de fatores de forma dos cristais de cada morfotipo de bactéria magnetotática está representada nas Figuras 36, 37 e 38. A distribuição do fator de forma desses cristais mostrou que os magnetossomos organizados em quatro cadeias na célula são ligeiramente mais alongados que os outros, tendo a maior parte dos magnetossomos distribuídos na faixa de 0,60 e 0,80 em comparação com os valores 0,50 a 0,65 encontrado para os magnetossomos desorganizados ou arranjados em duas cadeias. No entanto os maiores valores de fator de forma são encontrados nos magnetossomos organizados em duas cadeias,

sendo esses a minoria da população. A análise estatística baseada no fator de forma e a na distribuição dos diâmetros máximo e mínimo (Figura 39) mostraram que os magnetossomos das diferentes populações não são significativamente diferentes entre si.

Devido ao número limitado de amostras e à dificuldade de se coletar novamente, o estudo filogenético ainda não pode ser concluído, mas continua em andamento.

Tabela 1. Estatística dos magnetossomos das bactérias presentes nas amostras da Antártica.

	Média (nm)	Máximo (nm)	Mínimo (nm)	Desvio Padrão
Organização dos magnetossomos				
Duas cadeias (n=112)				
Diâmetro máximo	112	174	31	35
Diâmetro mínimo	68	106	20	20
Fator de forma	0,6	1,0	0,4	0,1
Quatro cadeias (n=81)				
Diâmetro máximo	97	132	39	21
Diâmetro mínimo	67	97	21	17
Fator de forma	0,7	0,9	0,5	0,1
Cadeias desorganizadas (n=92)				
Diâmetro Máximo	83	105	44	28
Diâmetro mínimo	46	65	25	7
Fator de forma	0,7	0,8	0,4	0,1

Figura 33 Micrografia eletrônica de transmissão do morfotipo de bactéria magnetotática mais abundante nas amostras coletadas na Antártica. Esse morfotipo se diferencia dos outros pela presença de duas cadeias de magnetossomos. A barra de escala indica 100 nm.

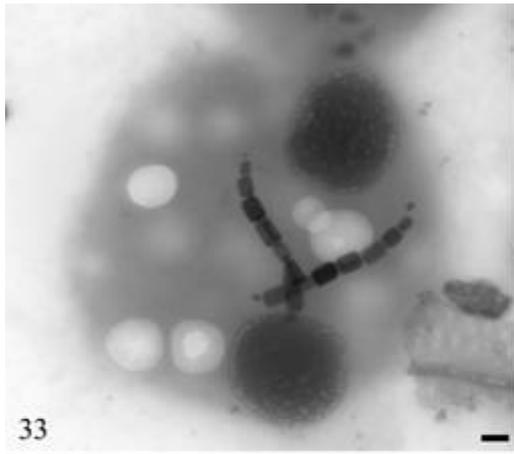
Figura 34 Micrografia eletrônica de transmissão de um morfotipo de bactéria magnetotática encontrada nas amostras coletadas na Antártica. Esse morfotipo é caracterizado pela presença de quatro cadeias de magnetossomos. A barra de escala indica 100 nm.

Figura 35 Micrografia eletrônica de transmissão de outro morfotipo de bactéria magnetotática presente nas amostras da Antártica em que os magnetossomos se encontram desorganizados. A barra de escala indica 100 nm.

Figura 36 Distribuição do fator de forma dos magnetossomos de duas cadeias, n=112.

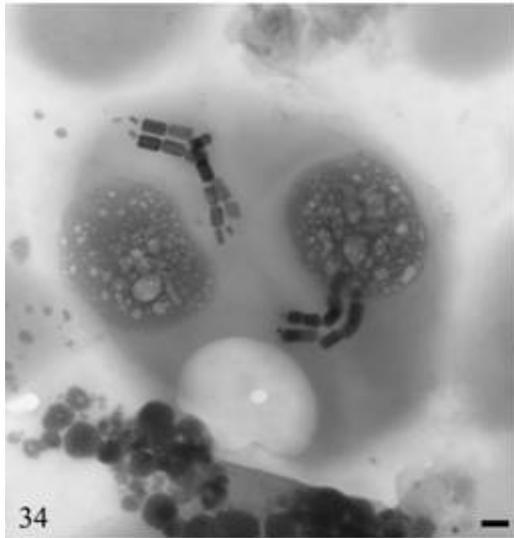
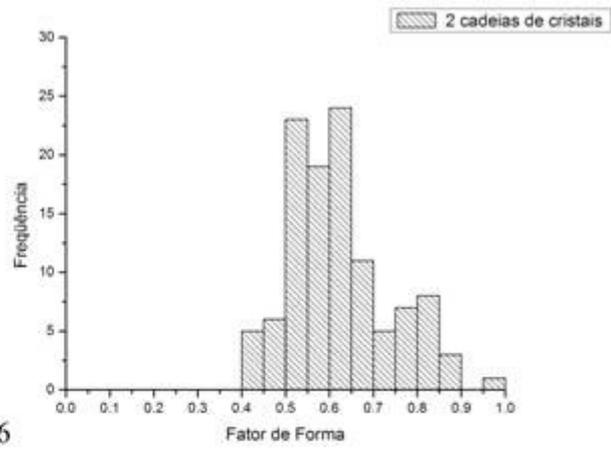
Figura 37 Distribuição do fator de forma dos magnetossomos de quatro cadeias, n=81.

Figura 38 Distribuição do fator de forma dos magnetossomos desorganizados, n=92.



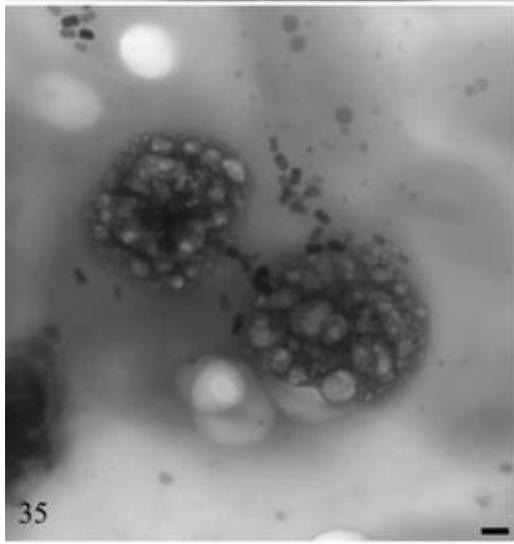
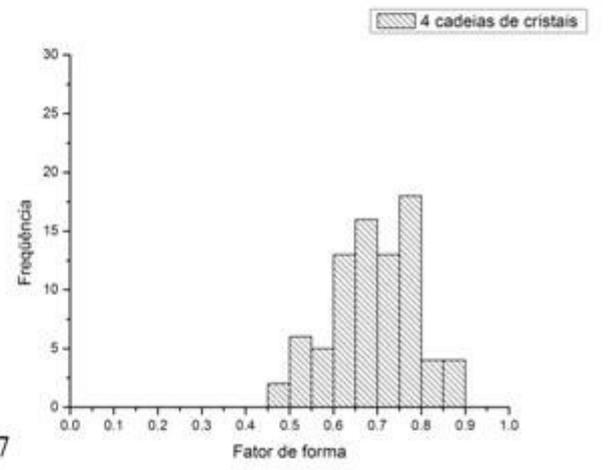
33

36



34

37



35

38

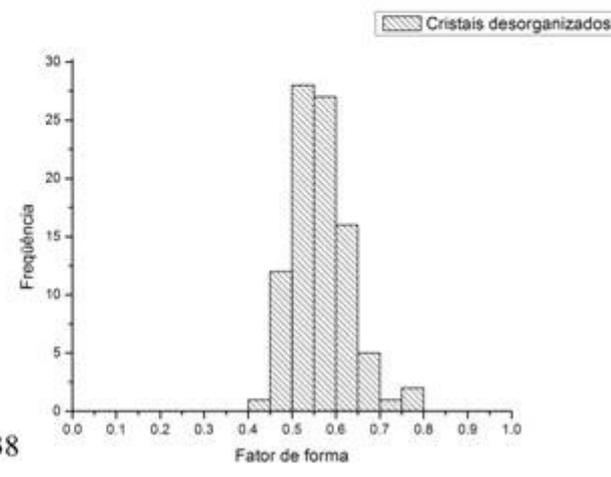
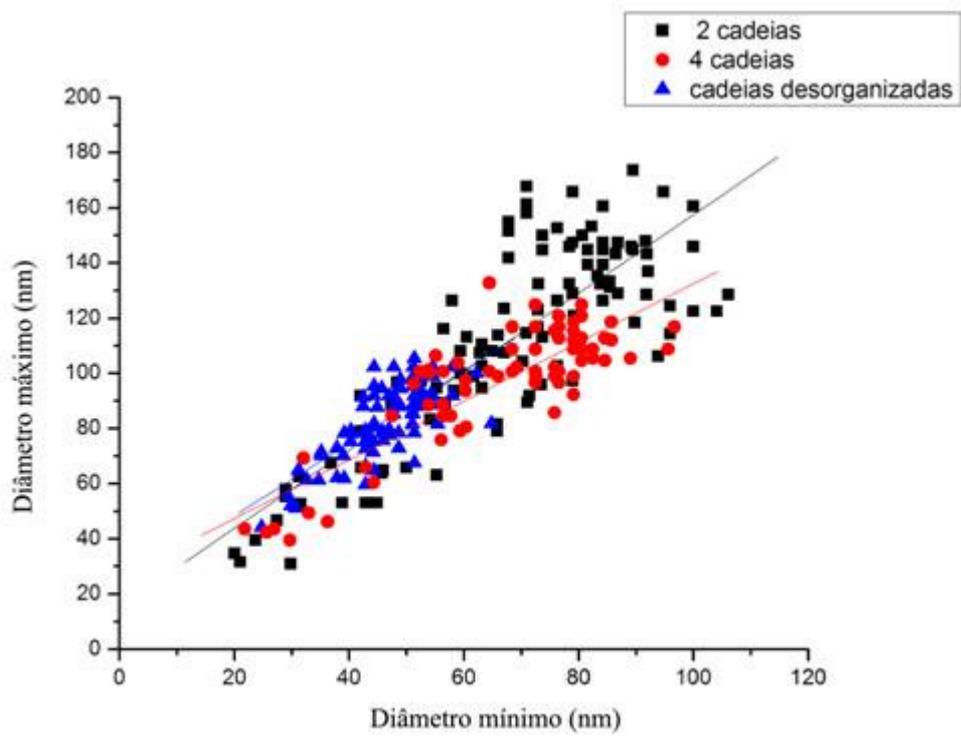


Figura 39 Distribuição dos diâmetros máximo e mínimo dos magnetossomos das bactérias magnetotáticas de Punta Ullman, Antártica e o *fit* linear de cada grupo. No gráfico estão representados os magnetossomos das bactérias que apresentam duas e quatro cadeias de magnetossomos e das que possuem cadeias desorganizadas. Note que as populações de magnetossomos organizados em duas e quatro cadeias e de magnetossomos desorganizadas estão agrupadas, não sendo possível sua distinção pela característica analisada.



4.5 Diversidade, fisiologia e interações interespecíficas de “*Ca. M. multicelulares*”

Coletas em diferentes pontos da Lagoa de Araruma (Praia Seca, CNA e Iguaba) foram feitas com a finalidade de observar a diversidade de “*Ca. M. multicellularis*”. A análise filogenética desses microrganismos baseada no gene *rrs* não os separou em grupos diferentes como ocorreu para MMPs de outros locais (Figura 40). A árvore filogenética contendo seqüências de MMPs e nMMPs mostra a separação desses microrganismos em ramos exclusivos. A similaridade do gene *rrs* de MMPs de diferentes locais de coleta na Lagoa de Araruama foi de 99% ou 100%.

A partir da amostra enriquecida em “*Ca. M. multicellularis*” foi possível a amplificação do gene *aprA*, que codifica a enzima adenosina-5'-fosfato redutase, o que sugere que o microrganismo é capaz de reduzir o sulfato. Quatro seqüências parciais do gene foram obtidas pela amplificação da amostra usando iniciadores degenerados (Figura 41). A análise filogenética mostrou que o clone 4 é provavelmente proveniente de um outro microrganismo não eliminado durante a concentração magnética. Já os clones 1,2 e 3 estão diretamente relacionados com espécies bacterianas próximas a “*Ca. M. multicellularis*”, inclusive ao gene *aprA* descrito para “*Ca. M. litorale*” (WENTER *et al.*, 2009).

Através do uso do corante Syto9 (Molecular Probes), foi possível notar a presença de diversas bactérias aderidas à superfície do microrganismo (Figura 42). Dessa forma, novas coletas foram feitas em locais em que é conhecida a existência de MMPs (Praia Seca e Iguaba na Lagoa de Araruama e Lagoa Rodrigo de Freitas), com a finalidade de observar se essa interação se repetia. Os resultados mostram a presença dessas bactérias em todos os locais de coleta (Figura 42a, b e c).

Para investigar se essa interação entre microrganismos era provocada durante a concentração magnética, novas amostras foram coletadas em Praia Seca, local de maior abundância de “*Ca. M. multicellularis*”, em amostradores. Concentradores utilizados na concentração magnética foram autoclavados e a água da Lagoa filtrada antes de ser colocada no concentrador. Apenas o quarto centímetro de sedimento foi utilizado na concentração magnética por este ser o local em que “*Ca. M. multicellularis*” são encontrados em maior número. Os resultados mostram que essa interação não é um artefato gerado durante a concentração magnética usual (Figura 42d).

Por MEV e MET foi possível observar que a bactéria que se encontra aderida na superfície de “*Ca. M. multicellularis*” é um bastonete de aproximadamente 1 μm

de comprimento (Figura 43), presente em número considerável (Figura 44). Essas bactérias são morfologicamente idênticas e parecem ter uma cápsula espessa que pode ser responsável por sua fácil aderência (Figura 44). Algumas vezes foi possível notar através da microscopia eletrônica de transmissão a presença de algumas dessas bactérias entre as células do “*Ca. M. multicellularis*”, mas provavelmente, nessa ocasião o MMP devia estar desagregando e, por isso, o acesso a essa região foi possível (Figura 45). A amplificação e sequenciamento do gene *rrs* de “*Ca. M. multicellularis*” teve repetidas vezes como resultado sequências relativas a bactéria do gênero *Pseudoalteromonas*, o que indica bactérias envolvidas na interação pertencem a esse gênero (Figura 46).

Figura 40 Árvore filogenética baseada no gene *rrs* dos MMPs encontrados na Lagoa de Araruama, mostrando sua posição na classe *Deltaproteobacteria*, assim como outros os procariotos multicelulares magnetotáticos. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 réplicas. A barra indica 2% de divergência.

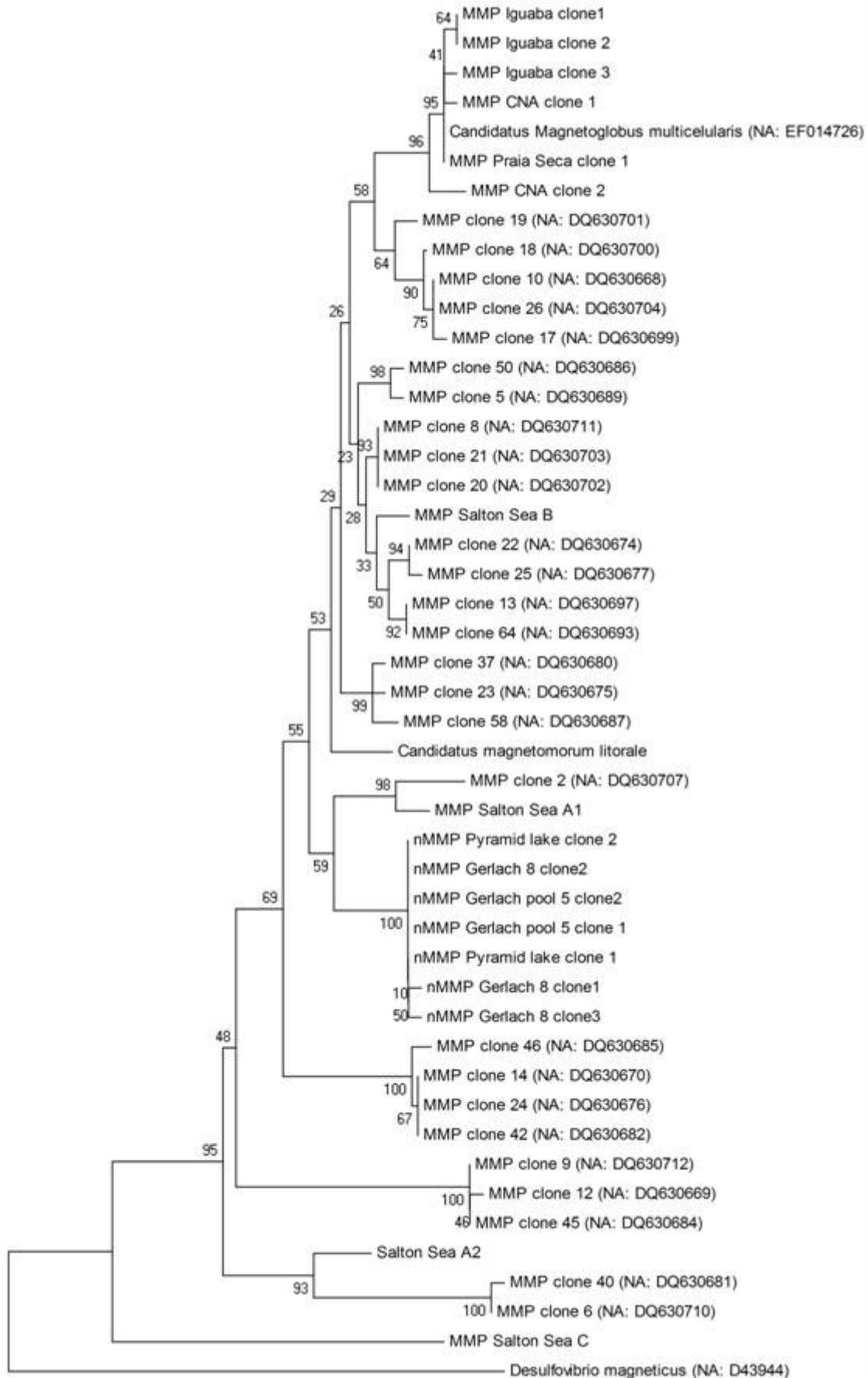


Figura 41 Árvore filogenética baseada no gene *aprA* obtido pela amplificação de amostras enriquecidas em “*Ca. M. multicellularis*”, mostrando proximidade em relação a “*Ca. M. litorale*”. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 replicas. A barra indica 5% de divergência.

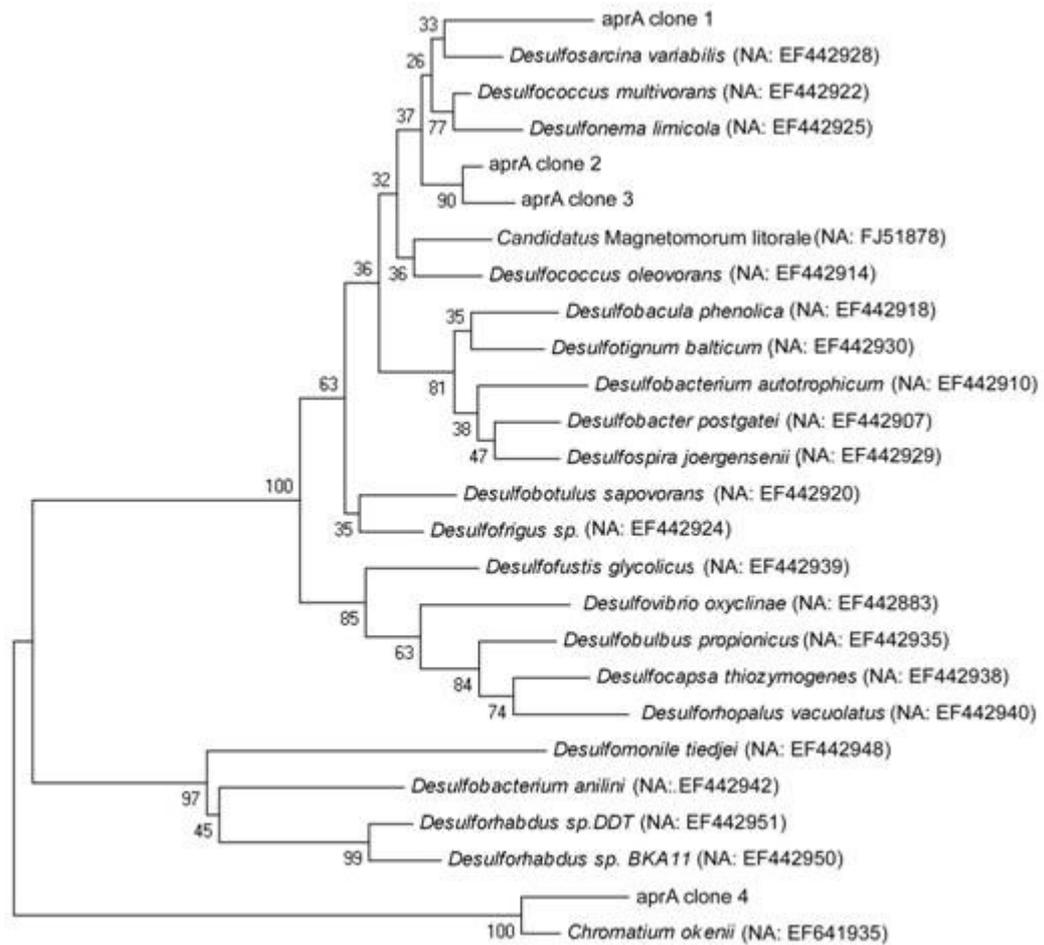


Figura 42 Micrografia de fluorescência de “*Ca. M. multicellularis*” coletados em (a) Praia Seca, (b) Iguaba e na (c) Lagoa Rodrigo de Freitas corados com Syto9. Praia Seca e Iguaba são cidades que beiram a Lagoa de Araruama. Em (d) está o resultado obtido após coleta em amostrador, fracionamento do sedimento, concentração magnética em concentrador e água previamente esterilizados e observação da suspensão de “*Ca. M. multicellularis*” corados. Note a presença de diversas bactérias na superfície do microrganismo em todos os casos, sugerindo que essa relação interspecífica não está sendo gerada durante a manipulação da amostra coletada em microcosmo. A barra de escala indica 10 μm .

Figura 43 Micrografia eletrônica de varredura de amostra de “*Ca. M. multicellularis*” preparada logo após a concentração magnética. Note a presença de diversos bastonetes pequenos na superfície do microrganismo. A barra de escala indica 1 μm .

Figura 44 Micrografia eletrônica de transmissão de amostra de “*Ca. M. multicellularis*” preparada logo após a concentração magnética. Note a presença de diversas células contendo cápsula espessa na superfície do microrganismo. A barra de escala indica 300 nm. O inserto mostra em maior aumento a região de contato entre as duas bactérias; a barra de escala indica 100 nm.

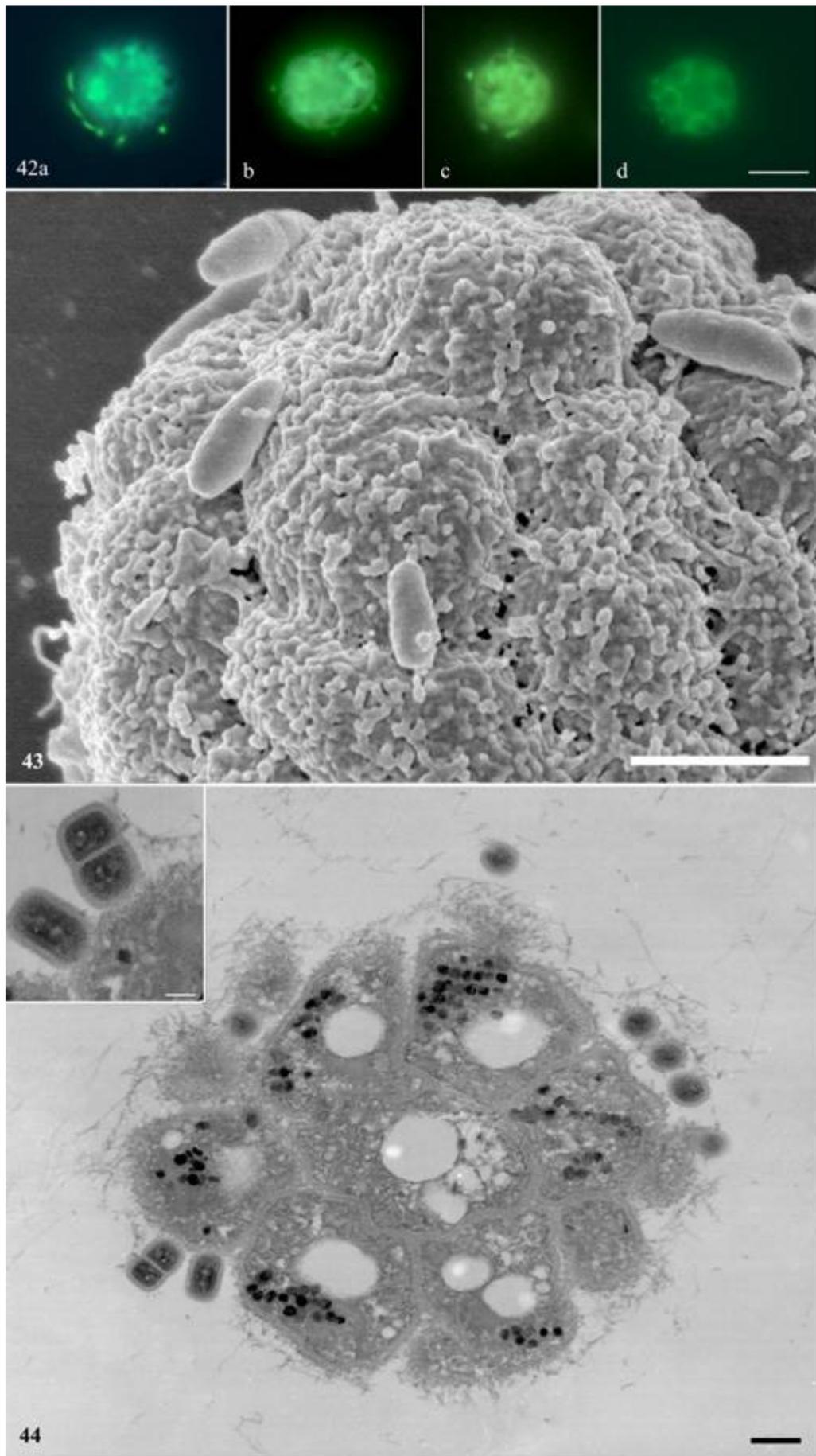
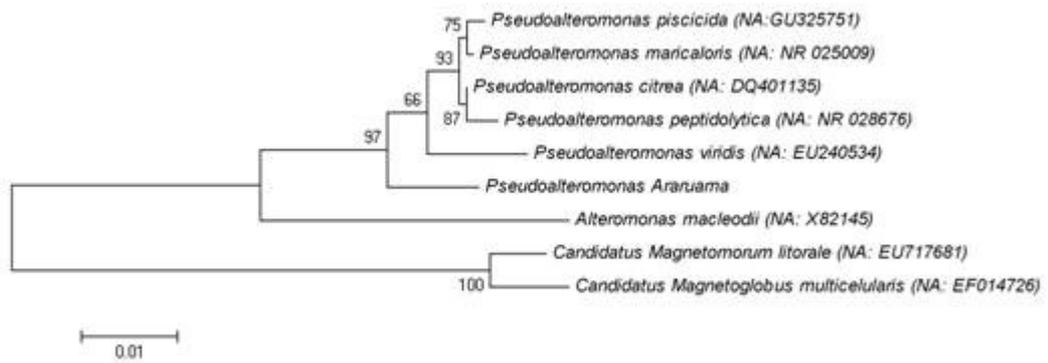
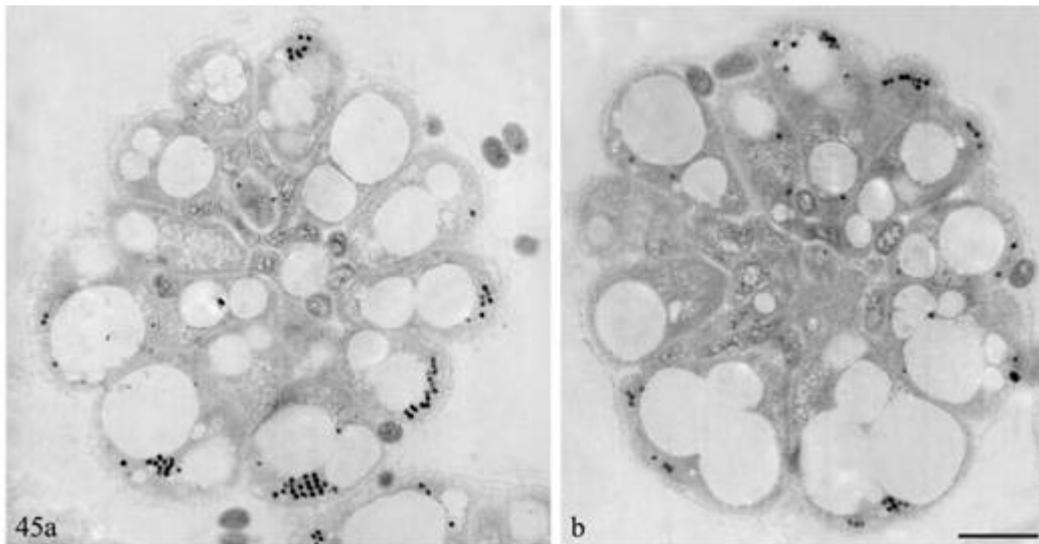


Figura 45 Micrografias eletrônica de transmissão de “*Ca. M. multicellularis*” preparada de acordo com a citoquímica de sítios de afinidade por cálcio. Note a presença de diversas células arredondadas na superfície do microrganismo e, em alguns, casos entre suas células. A barra de escala indica 300 nm nas duas imagens.

Figura 46 Árvore filogenética baseada na seqüência parcial do gene *rrs* obtido pela amplificação de amostras enriquecidas em “*Ca. M. multicellularis*”, mostrando a posição filogenética da bactéria cujo gene *rrs* não relacionado aos MMPs é freqüentemente encontrado na amplificação do gene a partir da amostra obtida na concentração magnética. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 replicas. A barra indica 1% de divergência.



4.6 Ultraestrutura de “*Ca. M. multicelulares*”

4.6.1 Adesão celular

A permeabilidade entre as células de “*Ca. M. multicellularis*” foi investigada pelo uso do corante fluorescente Lucifer yellow (Sigma). Amostras concentradas magneticamente foram imediatamente coradas e observadas ao microscópio de fluorescência. Os resultados mostraram que o corante é capaz de penetrar entre as células e chega ao compartimento interno (Figura 47; inserto). Muitas vezes, principalmente em microrganismos de maior volume e em estágios avançados do ciclo de vida, é possível observar maior marcação entre algumas células (Figura 47; inserto). Isso sugere que essa região possa ser um “canal” maior para a entrada do corante, indicando menor aderência entre as células. É importante notar que durante a observação as células respondiam ao campo magnético e nadavam com velocidade normalmente observada para o microrganismo, o que mostra que os MMPs não estavam morrendo ou desagregando.

A citoquímica de Thiery revelou a presença de uma fina camada de carboidratos entre células adjacentes (Figuras 47 e 48). Foi observado, na maioria dos casos, que a camada de polissacarídeos encontrada na parte da célula em contato com o compartimento interno é mais espessa e possivelmente responsável por manter as células unidas (Figura 49). Os resultados ainda mostram que existe uma cápsula frouxa e espessa de carboidratos na face celular voltada para o ambiente externo (Figura 50 e 51).

A citoquímica do piroantimoniato de potássio mostrou a presença de precipitados ao longo da superfície do microrganismo e entre células adjacentes (Figura 52 e 53). Já através da citoquímica de sítios de afinidade por cálcio foi observada a presença de uma estrutura fina no citoplasma das células onde ocorre a adesão celular (Figura 54; setas). A distância dessa estrutura a partir da membrana celular é de aproximadamente 10 nm, e também está presente no mesmo local na célula do lado oposto. A presença dessa estrutura não ocorre ao longo de toda superfície da célula, mas está preferencialmente localizada na região central de contato intercelular.

Outra estrutura de natureza desconhecida ficou bem evidente através do uso da citoquímica de sítios de afinidade por cálcio (Figura 55 e 56; setas). Essa estrutura já foi descrita anteriormente (FARINA *et al.*, 1983; SILVA *et al.*, 2007), mas através do uso da citoquímica utilizada foi possível sua melhor observação.

Nessas preparações foi possível notar a existência de uma estrutura periódica próxima à cadeia de magnetossomos; estruturas similares também podem ser observadas próximas à membrana células (Figura 55; ponta de seta). Essas estruturas estriadas possuem comprimentos variados que parecem depender do tamanho da célula, sendo 1,5 μm o maior observado (Figura 56). A espessura medida para essa estrutura foi de aproximadamente 25 nm em todos os casos.

Figura 47 Corte ultrafino de "*Ca. M. multicellularis*" da região central do microrganismo preparado de acordo com a citoquímica de Thiery. Note a presença de uma camada de carboidratos entre as células. Inseto mostra a microscopia de fluorescência de microrganismos corados com Lucifer yellow. Observe que o corante é capaz de penetrar entre as células e chegar ao compartimento interno, sendo algumas regiões intercelulares mais marcadas que outras. A barra de escala indica 300 nm e 5 μ m no inserto.

Figura 48 Citoquímica de Thiery de "*Ca. M. multicellularis*" mostrando uma região do microrganismo mais próxima da superfície. Note a presença de uma camada de carboidratos homogênea entre as células. A barra de escala indica 300 nm.

Figura 49 Corte ultrafino preparado pela citoquímica de Thiery mostrando espessa camada de carboidratos no compartimento interno. A barra de escala indica 100 nm.

Figura 50 Micrografia eletrônica de transmissão da Citoquímica de Thiery mostrando em detalhe o contato entre duas células de "*Ca. M. multicellularis*". Note a presença da capsula de carboidratos na superfície do microrganismo. A barra de escala indica 100 nm.

Figura 51 Micrografia eletrônica de transmissão da Citoquímica de Thiery mostrando em detalhe a cápsula na superfície de "*Ca. M. multicellularis*". Note que ela se estende por aproximadamente 300 nm, mas possui aspecto rarefeito. A barra de escala indica 100 nm.

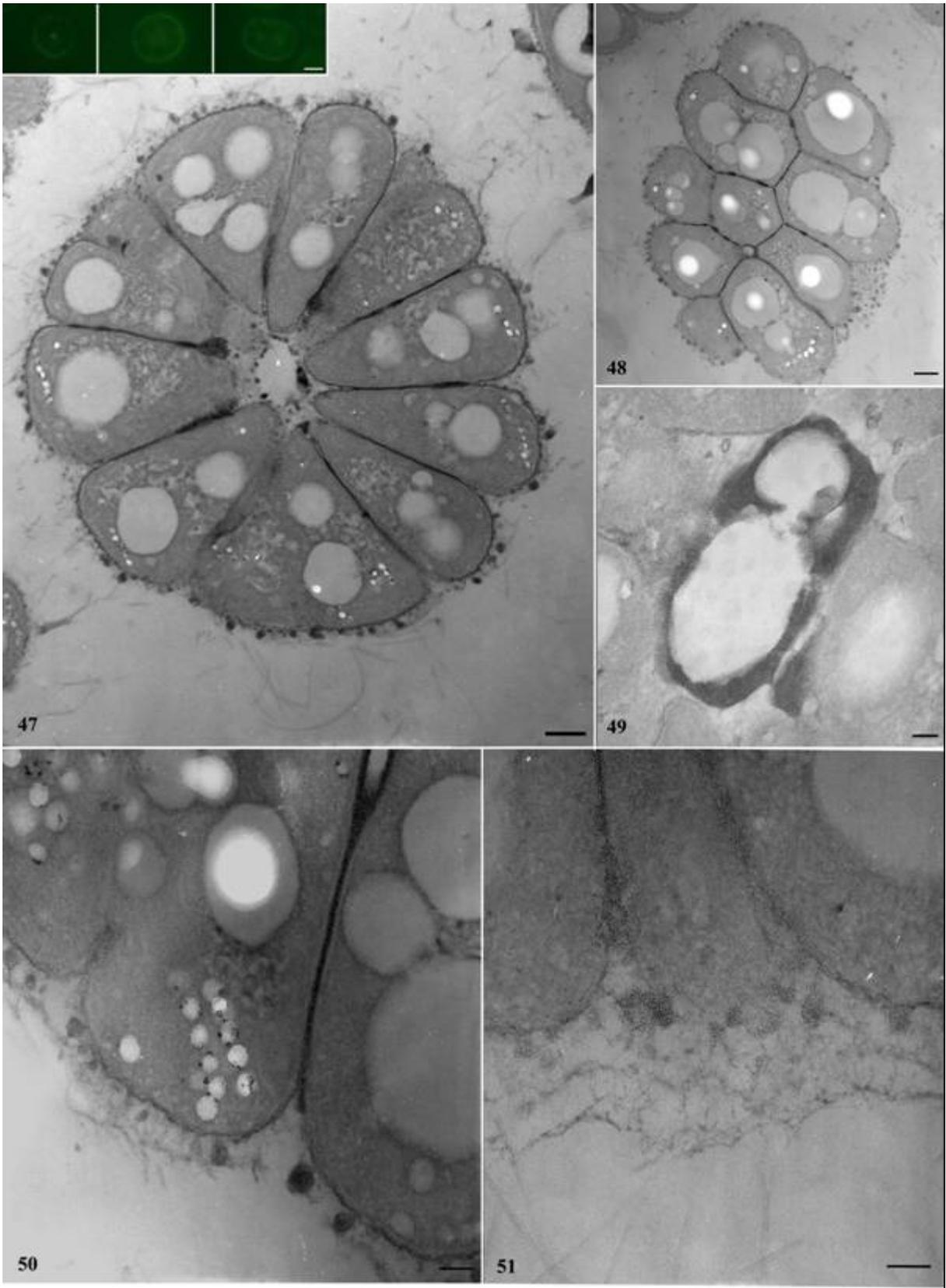


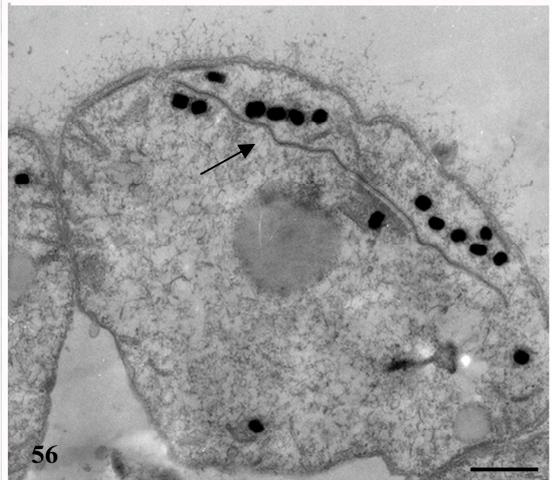
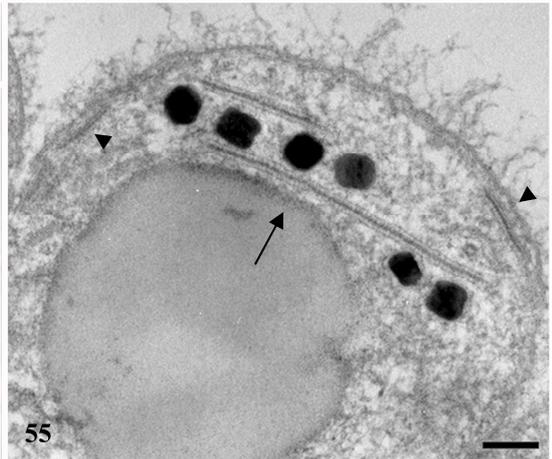
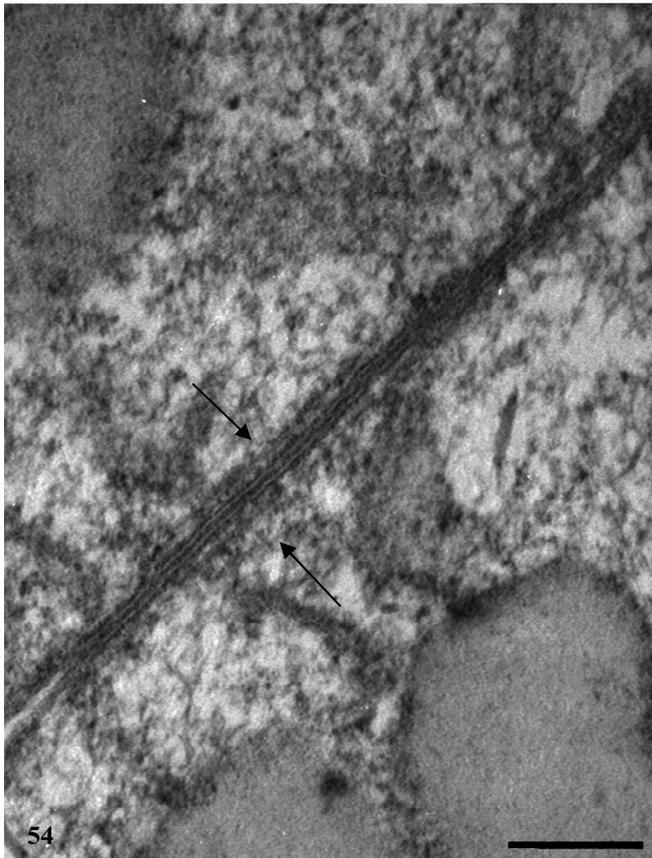
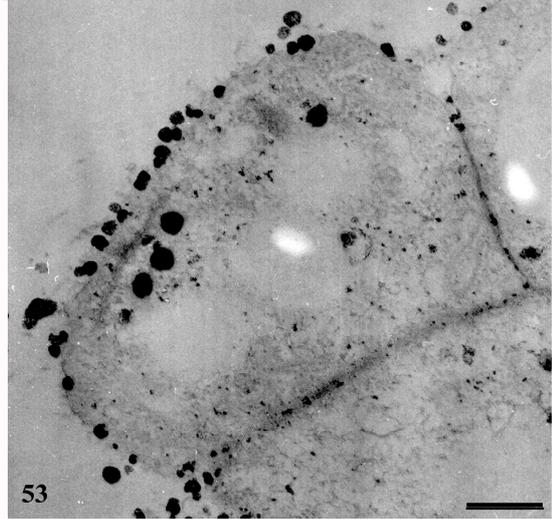
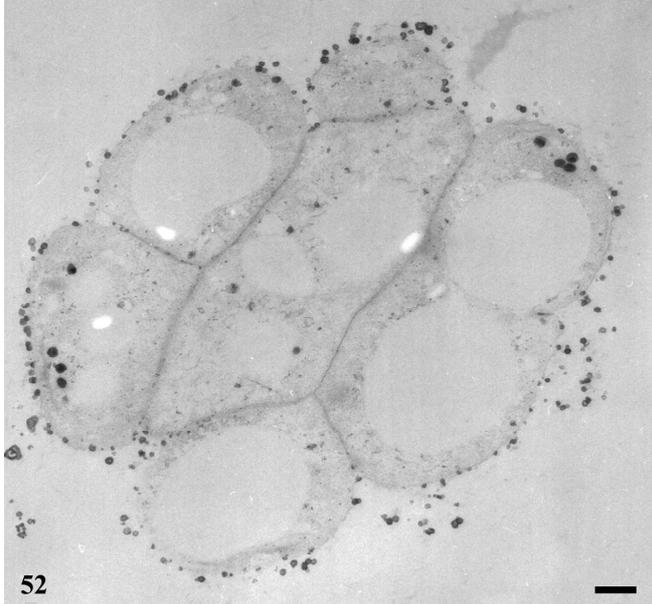
Figura 52 Citoquímica do piroantimoniato de potássio em amostras de “*Ca. M. multicellularis*” mostrando precipitados elétrondensos na superfície e entre as células. A barra de escala indica 300 nm.

Figura 53 Micrografia eletrônica de transmissão de amostra preparada segundo a citoquímica do piroantimoniato de potássio mostrando a célula de “*Ca. M. multicellularis*” em maior aumento. Note a presença de precipitados pontuais entre as células. A barra de escala indica 400 nm.

Figura 54 Citoquímica de sítios de afinidade por cálcio em “*Ca. M. multicellularis*” mostrando a presença de uma estrutura fina no citoplasma das células onde ocorre a adesão celular. A barra de escala indica 60 nm.

Figura 55 Corte ultrafino de uma célula de “*Ca. M. multicellularis*” preparada segundo a citoquímica de sítios de afinidade por cálcio mostrando uma estrutura intracelular de 25 nm sempre encontrada associada aos magnetossomos. A barra de escala indica 100 nm.

Figura 56 Citoquímica de sítios de afinidade por cálcio mostrando que a estrutura estriada próxima aos magnetossomos se estende pelo comprimento da célula. Note que o tamanho dessa estrutura parece ser proporcional ao da célula. A barra de escala indica 300 nm.



4.6.2 Reconstrução tridimensional e elementos de citoesqueleto

A reconstrução tridimensional a partir de cortes seriados contendo estrutura estriada mencionada no tópico acima mostrou que esta forma uma espécie de placa contínua na célula (Figura 57a e b). Resultados também mostraram que a estrutura é repartida entre as células-filhas durante a divisão celular, indicando sua possível participação na divisão dos magnetossomos entre as células-filhas.

Através da observação de cortes ultrafinos é possível concluir que a divisão celular ocorre da parte voltada para o ambiente externo em direção ao compartimento interno, sendo esse o maior eixo da célula sob o ponto de vista do corte ultrafino (Figura 58). No entanto, resultados obtidos através da reconstrução tridimensional de cortes ultrafinos em série mostram que a constrição celular ocorre simetricamente a partir das duas regiões opostas (Figura 59). Considerando o volume celular, pode-se perceber que, ao contrário do que é visto no corte ultrafino, a constrição responsável pela divisão celular ocorre no menor eixo da célula e permite que as células-filhas mantenham sua polaridade, com uma face voltada para o ambiente externo e outra para o compartimento interno. Uma vez que a constrição celular ocorra dessa forma, é possível que as cadeias de magnetossomos sejam divididas entre as células filhas. Durante a observação dos cortes ultrafinos em série no MET para aquisição de imagens, não foi observada a divisão sincronizadas descrita anteriormente.

Os genes que codificam as proteínas de divisão celular FtsZ, envolvida na divisão celular, e MreB, homóloga a actina e de função relacionada a manutenção da forma da célula, foram amplificados a partir de amostras enriquecidas pela concentração magnética. Análise filogenética baseada nesses genes mostrou que FtsZ e MreB de "*Ca. M. multicellularis*" tem como seqüências mais próximas as de *Desulfococcus oleovorans*, cuja identidade foi de 70%, e *Desulfobacterium autotrophicum*, cuja identidade foi de 87%, respectivamente (Figura 60 e 61). O objetivo da amplificação desses genes estava relacionado à obtenção das respectivas proteínas através de sua expressão em vetor e então de anticorpos específicos que possibilitassem sua localização. Infelizmente não foi possível a obtenção das proteínas até o momento.

A reconstrução tridimensional de aproximadamente metade de um "*Ca. M. multicellularis*" mostrou que os magnetossomos estão distribuídos nas células do microrganismo de forma que suas cadeias fiquem alinhadas no microrganismo

como um todo (Figura 62a e b). Alguns magnetossomos foram observados isoladamente, sem que estejam, ao menos, próximos a elas (Figura 62b). As células que formam o "*Ca. M. multicellularis*", em geral, possuem tamanho semelhante (Figura 62c). No, entanto, a forma das células não é sempre uniforme, mas parece ser dependente de sua interação com as células vizinhas (Figura 62c). Observe que as porções externas das células apresentam formato arredondado, mas quando há contato com a célula vizinha essas deixam de ter essa característica e seguem como planas até a região do compartimento interno.

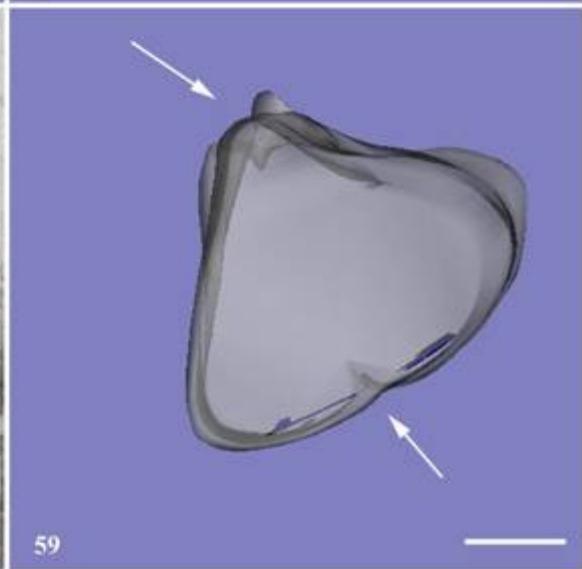
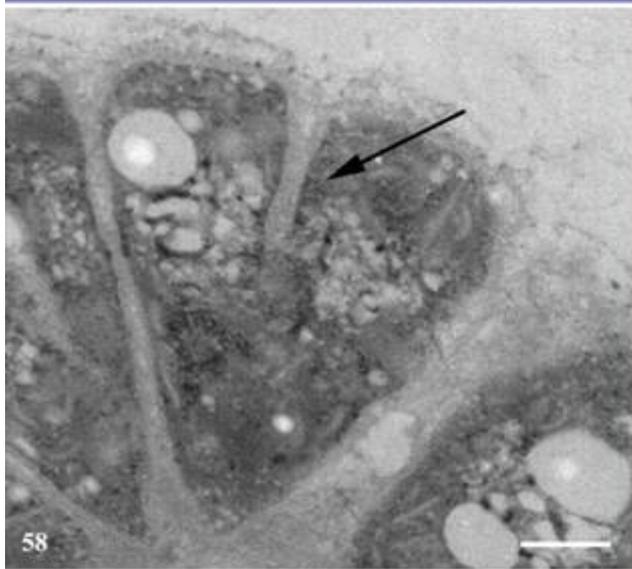
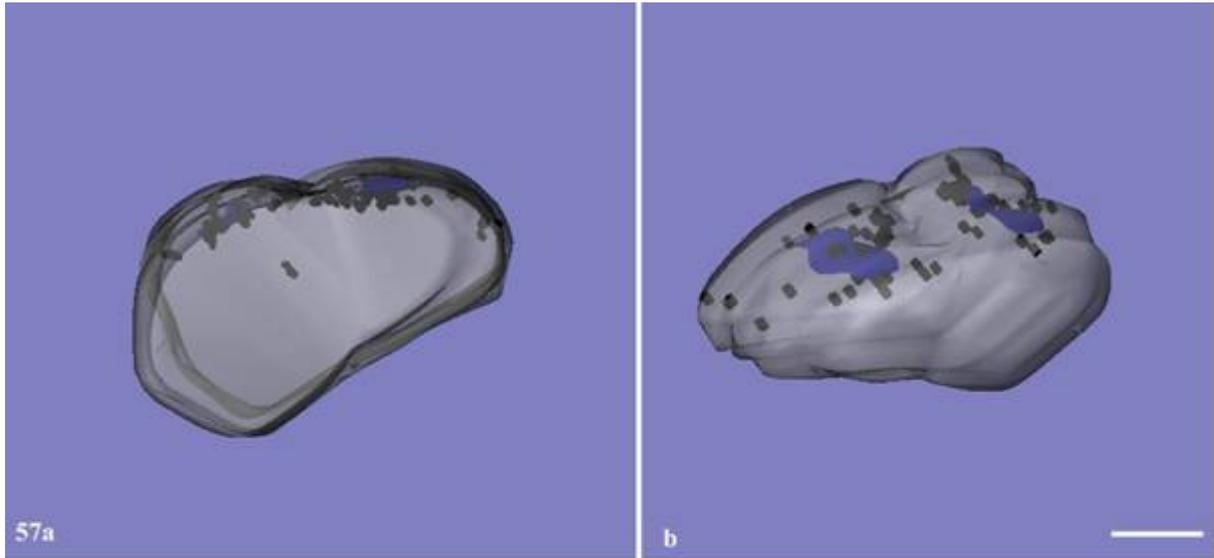
Figura 57 Reconstrução tridimensional da estrutura estriada presente nas células de “*Ca. M. multicellularis*”. (a) Note que ela é contínua na célula e (b) dividida para os pólos da célula durante a divisão celular. As setas indicam o septo e divisão. A barra de escala indica 500 nm.

Figura 58 Micrografia eletrônica de transmissão de “*Ca. M. multicellularis*” mostrando uma célula em divisão. A barra de escala indica 300 nm.

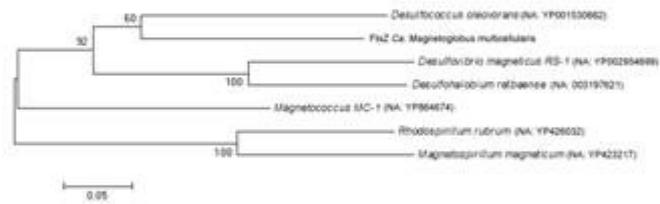
Figura 59 Reconstrução tridimensional de uma célula de “*Ca. M. multicellularis*” em divisão. Note que o início da constrição celular ocorre simetricamente na célula (setas). A barra de escala indica 600 nm.

Figura 60 Árvore filogenética baseada no gene *ftsZ* de “*Ca. M. multicellularis*” obtido a partir da amplificação usando iniciadores degenerados. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 réplicas. A barra de escala indica 5% de divergência.

Figura 61 Árvore filogenética baseada no gene *mreB* de “*Ca. M. multicellularis*” obtido a partir da amplificação usando iniciadores degenerados. Os valores de *bootstrap* foram calculados para 1000 réplicas. A barra de escala indica 5% de divergência.



60



61

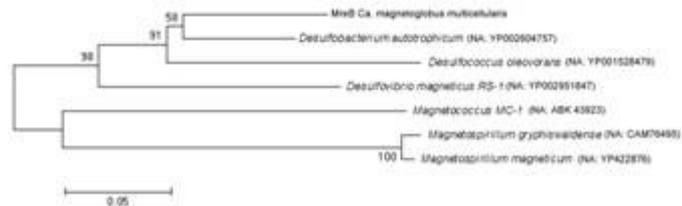
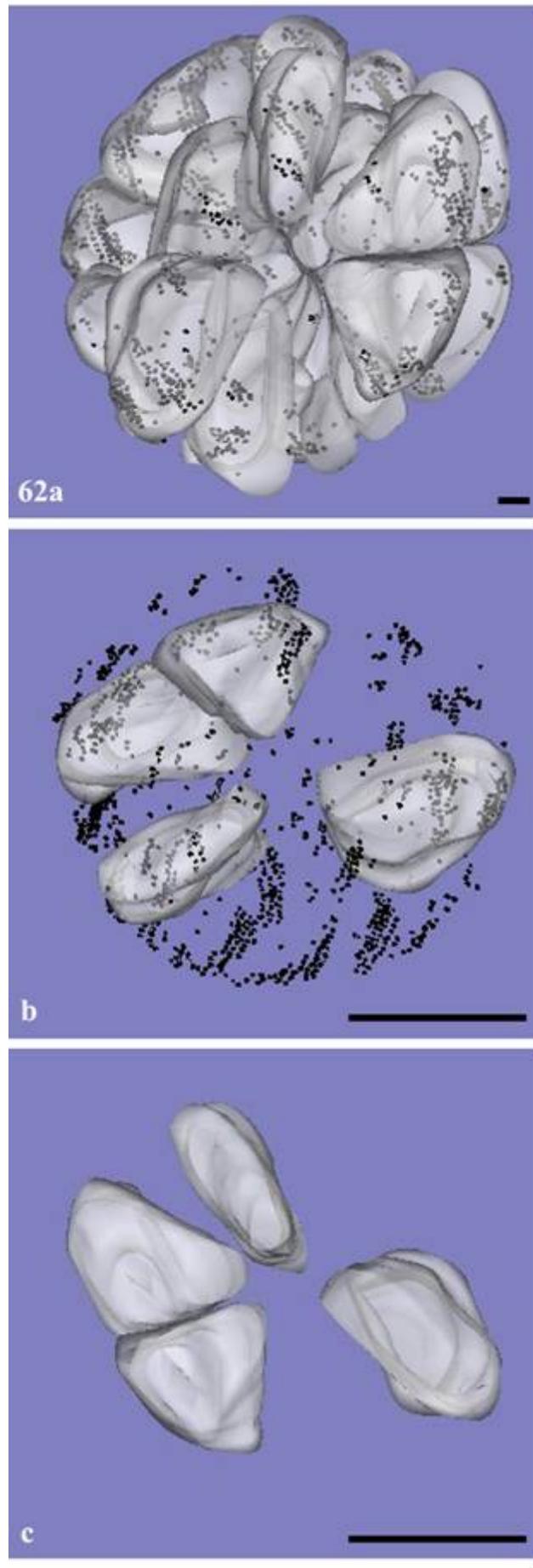


Figura 62 Reconstrução tridimensional de aproximadamente metade de “*Ca. M. multicellularis*” mostrando a organização das células no microrganismo. (a) reconstrução tridimensional feita utilizando todas as células de um microrganismo presente nos cortes; (b) mesma reconstrução apresentada em (a), mas com outra orientação, nesse caso algumas células foram excluídas e seus magnetossomos mantidos para melhor observação das cadeias de magnetossomos; (c) mesma reconstrução apresentada em (a), mas com a exclusão dos magnetossomos e algumas células com objetivo de destacar a forma e tamanho das células. Note que o formato de cada célula parece ser dependente do contato com as células adjacentes e que os magnetossomos de todo o microrganismo estão alinhados em uma direção. A barra de escala indica 500 nm em (a) e 5 μm em (b) e (c).



5. Discussão

5.1 Distribuição de bactérias magnetotáticas em ambientes extremos

Até o momento, acredita-se que as bactérias magnetotáticas sejam encontradas em ambientes mesofílicos e que seu cultivo seja de extrema dificuldade por se tratar de um grupo de microrganismos oligotróficos caracterizados pelo crescimento lento, baixa taxa de metabolismo e pequena densidade populacional.

As espécies encontradas e descritas aqui contribuem significativamente para aumentar o conhecimento sobre a diversidade de procariotos magnetotáticos. BW-1, o bastonete produtor de greigita encontrado em *Bad Water*, Vale da Morte, é o primeiro bastonete desse tipo descrito para a classe *Deltaproteobacteria*. Já BW-2, é a primeira bactéria magnetotática descrita em *Gammaproteobacteria* que produz cristais de magnetita. A bactéria HSMV-1 é até o momento a única bactéria magnetotática que pode ser considerada, pelo menos, moderadamente termófila pertencente ao filo *Nitrospira*, mas não muito próxima de “*Ca. M. bavaricum*”, o que pode indicar que possa existir a mesma diversidade de bactérias magnetotáticas nesse filo como é encontrado em *Proteobacteria*.

A diversidade de morfotipos de bactérias magnetotáticas nas amostras da Antártica indica que existem pelo menos três morfotipos diferentes de cocos nessas amostras. Apesar de a análise estatística de características dos magnetossomos como diâmetros máximo, mínimo e fator de forma não apontar diferença significativa entre os cristais encontrados nas bactérias, se for considerado o número de magnetossomos por célula, percebe-se que se trata de populações diferentes, representando possivelmente espécies distintas. No entanto, a análise filogenética, que ainda está em andamento, é decisiva para determinar o número de espécies na amostra. Resultados não mostrados, mas obtidos de amostras coletadas em outros locais costeiros na Antártica, mostraram a existência de cocos, espirilos e bastonetes na região. Esses resultados já são muito importantes para a reavaliação dos ambientes em que são encontrados representantes do grupo de bactérias magnetotáticas, mas o aprofundamento do estudo pode levar à descrição de novos gêneros e/ou espécies de bactérias magnetotáticas, talvez, pertencentes a diferentes classes ou filios e à identificação de outros genes relacionados à biomineralização. Todas essas informações são decisivas para a compreensão da evolução da magnetotaxia no domínio *Bacteria*.

A diversidade de MMPs avaliada mostra que os MMPs da Lagoa de Araruama apresentam menor diversidade que os encontrados em outros locais como *Salton Sea*, sendo sua distribuição filogenética similar a dos nMMPs. Talvez o aumento do número de pontos de coleta na Lagoa de Araruama, incluindo os que possuem menores valores de salinidade, e a análise filogenética de amostras sazonais possam mostrar a mesma diversidade encontrada para a população de MMPs em *Salton Sea* (California, EUA) e *Little Sippewissett* (Massachusetts, EUA; SIMMONS & EDWARDS, 2007). Segundo Simmons & Edwards (2007), a diversidade encontrada em *Little Sippewissett* sugere que cada linhagem de MMP ocupe um nicho diferente no ambiente que é provavelmente definido pela utilização de substrato e potencial redox. O fato de não ter sido encontrada tamanha diversidade entre as populações de “*Ca. M. multicellularis*” e os nMMPs também pode estar relacionado as características ambientais que não contribuíram ou contribuem para formação dos micro-nichos. A amplificação do gene *aprA* na amostra enriquecida em “*Ca. M. multicellularis*” e sua relação filogenética com as bactérias redutoras de sulfato sugere que esse microrganismo pode ser capaz de reduzir o sulfato, o que indicaria algumas das condições necessárias para seu cultivo.

A diversidade encontrada nas coletas feitas durante esse trabalho mostra que os procariotos magnetotáticos podem ter uma distribuição muito maior do que a imaginada, e que nenhum tipo de ambiente aquático pode ser descartado na procura de novas espécies. Uma das coletas realizadas e não descritas nos resultados foi feita em um lago hipersalino, alcalino (pH 10) e rico em arsênio na Califórnia, *Mono Lake*, onde foi encontrado um espirilo magnético. Inicialmente acreditava-se que o microrganismo em questão pudesse ser uma arquea, levantando a hipótese de transferência lateral dos genes da ilha do magnetossomo entre representantes dos domínios. No entanto, foi concluído após FISH que o microrganismo em questão pertencia ao domínio *Bacteria*. Esses resultados não foram descritos porque não foi possível caracterizar o microrganismo de forma a permitir o mínimo necessário em sua identificação. De qualquer forma, a suspeita inicial de que pudesse ser uma arquea e o fato de já ter sido descrita uma alga magnetotática (TORRES DE ARAUJO *et al.*, 1986), nos levou a acreditar que a diversidade de microrganismos magnetotáticos pode estar sendo muito subestimada.

A observação de espécies de bactérias magnetotáticas em amostras de ambientes com características extremas mostra a existência de bactérias magnetotáticas termófilas, psicrófilas e até mesmo resistentes a variações de condições ambientais em um curto período. Esses resultados e o fato de bactérias magnetotáticas já terem sido descritas em ambientes ricos em matéria orgânica (SIMMONS & EDWARDS, 2007; KIRSCHVINK, 1980), alertam para necessidade de revisão de conceitos considerados comuns para esse grupo de procariotos. Essa ampliação do conhecimento sobre a diversidade de bactérias magnetotáticas e as características ambientais em que são encontradas é essencial para o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo; estudo da diversidade de biomineralizações; determinação de sua importância em ciclo biogeoquímicos como o do ferro e do enxofre e compreensão da magnetotaxia.

Além disso, o estudo da diversidade morfológica, com a caracterização dos magnetossomos, em ambientes com características extremas pode ajudar na interpretação do significado dos magnetofósseis na busca por vida extraterrestre. Características de magnetossomos como tamanho e forma, inexistência de defeitos cristalográficos, morfologia distinta quando comparados à magnetita de origem inorgânica e organização em cadeias são bioassinaturas do grupo que podem ser utilizadas na identificação de fósseis em meteoritos, o que faz deles indicadores de existência de vida extraterrestre (SUKUMARAN, 2005). Assim, a caracterização dos magnetossomos e sua organização em bactérias magnetotáticas de ambientes extremos aumentam as informações a respeito desses cristais biogênicos que podem ser utilizados para determinar a origem, biogênica ou não, de magnetofósseis.

5.2 Procariotos multicelulares magnéticos e não magnéticos

O fato de terem sido encontrados nMMPs em amostras de água doce e de esses estarem relacionados filogeneticamente aos MMPs, indica que a biomineralização de greigita também pode ser um processo que envolve a transferência lateral de genes, como ocorre para magnetita e põe em dúvida a afirmação de que os MMPs são característicos de ambientes salobros, marinhos ou hipersalinos.

Martins *et al.* (2009) mostrou que a distribuição de "*Ca. M. multicellularis*" na Lagoa de Araruama está relacionada à salinidade do local onde as amostras são

coletadas, estando esses microrganismos presentes apenas em locais com salinidade superior a 3,7% . A organização multicelular de todos os MMPs até hoje descritos sempre foi considerada dependente da salinidade da amostra, uma vez que quando adicionada água destilada na amostra era causada a desagregação de suas células (FARINA *et al.*, 1983; RODGERS *et al.*, 1990; ABREU *et al.*, 2006). A observação de nMMPs em amostras de água doce é intrigante e sugere que MMPs também possam ser encontrados nesses ambientes, assim como nMMPs possam também estar presentes nos ambientes salinos onde a forma multicelular magnetotática é encontrada, mas como não respondem ao campo magnético, não são enriquecidos durante a concentração magnética ou são confundidos com os MMPs durante a observação da amostra.

As similaridades entre os nMMPs e os MMPs são muitas, a exceção seria o movimento de *ping-pong* que foi identificado como dependente da força do campo magnético aplicado (GREENBERG *et al.*, 2005), sendo assim, é esperado que não seja apresentado pelos nMMPs. A resposta a diferentes comprimentos de luz já foram relatadas para os MMPs. Foi observado em "*Ca. M. multicellularis* que a luz verde é capaz de tornar o movimento de rotação na borda da gota mais intenso se comparado ao azul. Foi sugerido que esse comportamento ocorria porque a luz de maior comprimento de onda tem menor capacidade de penetração, sendo relacionada a camadas superiores do ambiente em que existe maior concentração de oxigênio, e o microrganismo, por estar em um ambiente desfavorável segundo a literatura, nadaria mais rápido como um mecanismo de proteção (ABREU, 2006). Já Almeida (2009) mostrou que pulsos de laser de ultravioleta causam a morte do MMP que recebeu diretamente o pulso e um efeito coletivo de fuga dos MMPs próximos. Dessa forma, foi sugerido que como "*Ca. M. multicellularis* vive no sedimento onde a incidência de luz é pequena, a luz possa ser um fator de estresse para esses microrganismos.

Além dessas informações citadas acima, os resultados obtidos através da caracterização do comportamento dos nMMPs quando iluminados com diferentes comprimentos de onda indicam que a desagregação e morte das células dos MMPs relatadas anteriormente (FARINA *et al.*, 1983; RODGERS *et al.*, 1990; ABREU *et al.*, 2006) deve ser causada por danos gerados pela luz utilizada durante a observação dos microrganismos ao microscópio óptico. Já é conhecido que a luz absorvida pelas células pode danificá-las se a energia for suficiente para quebrar ligações

covalentes de moléculas e, assim, gerar reações químicas que formam radicais livres (MURPHY, 2001). Essa hipótese está de acordo com os resultados que mostram que os nMMPs apresentam fototaxia negativa quando iluminados com luz de maior energia e que quando observados por microscopia de fluorescência, cuja intensidade é superior a luz branca, as células de nMMPs e MMPs desagregam levemente e, por mais que ainda continuem unidas em uma esfera, a esfera tem seu diâmetro aumentado, assim como o compartimento interno, indicando morte do microrganismo (dados não mostrados na tese). No entanto, como as informações sobre o comportamento de nMMPs e MMPs em relação a luz foram obtidas através de experimentos que avaliaram parâmetros diferentes não é possível uma conclusão aprofundada.

Bactérias não magnetotáticas morfologicamente semelhantes a espirilos magnéticos e pertencentes ao gênero *Magnetospirillum* já foram descritas (SHINODA *et al.*, 2000; GEELHOED *et al.*, 2009). Esses estudos foram realizados em bactérias do ambiente isoladas em culturas puras. A análise filogenética baseada no gene que codifica o rRNA 16S mostrou que a estirpe J10 apresenta 99,6% de identidade em relação à *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (GEELHOED *et al.*, 2009). Já a estirpe CC-26 apresenta 98,4% de identidade em relação à *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1; nesse caso a similaridade encontrada dentro do gênero foi de 94,5% a 98,4% (SHINODA *et al.*, 2000). Esses estudos, no entanto, avaliaram a capacidade de produzir magnetossomos pela observação, ao microscópio óptico, da existência ou não de resposta magnetotática nas culturas e a observação das células em cultura ao MET para verificação da presença de magnetossomos não foram feitas. Em nenhum desses trabalhos foi descrito se houve a verificação das amostras ambientais quanto à presença de bactérias magnetotáticas, o que coloca em dúvida se no ambiente as bactérias não magnetotáticas pertencentes ao gênero *Magnetospirillum* não produziam magnetossomos e não apresentavam resposta magnetotática.

A descrição dos nMMPs é primeiro relato de microrganismos encontrados em amostras ambientais tão similares morfologicamente e filogeneticamente a alguma bactéria magnetotática em que foi feita a observação ao MET, comprovando a ausência de magnetossomos. Além disso, o fato de os nMMPs apresentarem de 90 a 95 % de similaridade em relação ao gene *rrs* dos MMPs e de 99 a 100% de entre si, indica que eles podem ser considerados espécies diferentes do mesmo gênero.

Dessa forma, uma vez que a magnetotaxia é a característica mais importante do grupo de microrganismos citados acima, bactérias do gênero *Magnetospirillum* e MMPs, seria muito interessante do ponto de vista da evolução da magnetotaxia o estudo dos genes da ilha do magnetossomo nos genomas das bactérias não magnetotáticas, mas morfológicamente e filogeneticamente semelhantes à elas.

5.3 Interações interespecíficas envolvendo bactérias magnetotáticas

Interações de bactérias magnetotáticas com outros microrganismos só foram descritas nos casos de predação por protozoários (Bazylnski *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2007). A possível relação entre “*Ca. M. multicellularis*” e bactérias do gênero *Pseudoalteromonas* ainda não foi descrita na literatura, e seu estudo pode certamente indicar o tipo de comportamento do microrganismo no ambiente, como por exemplo, sua migração nas camadas do sedimento.

O gênero *Pseudoalteromonas* inclui bactérias heterotróficas, em forma de bastão, Gram-negativas, aeróbicas que habitam ambientes marinhos (GAUTHIER, GAUTHIER & CHRISTEN, 1995). Espécies pertencentes a esse gênero já foram isoladas de diversos ambientes marinhos no mundo e estão freqüentemente associadas a superfícies de hospedeiros eucarióticos como algas, moluscos, bivalves, tunicados, esponjas e plantas marinhas (THOMAS *et al.*, 2008). Durante a colonização de superfícies essas bactérias produzem compostos inibitórios contra bactérias, algas, fungos, protozoários e larva de invertebrados. Acredita-se que a ação desses compostos representem uma vantagem na colonização competitiva de superfícies marinhas vivas (MAI-PROCHNOW *et al.*, 2004). Os resultados apresentados não indicam o valor da relação ecológica entre “*Ca. M. multicellulares*” e *Pseudoalteromonas* sp. Essa relação teria caráter negativo caso essa espécie de *Pseudomonas* produzisse uma toxina antibacteriana capaz de provocar a morte da hospedeira, no entanto há a possibilidade de a relação ter caráter positivo com a produção de compostos que evitem a predação por protozoários. A observação da possível penetração entre as células do microrganismo hospedeiro sugere que a interação entre as bactérias não tem caráter positivo, no entanto esses resultados não são conclusivos e investigações adicionais são necessárias não só para realmente identificar *Pseudomonas* sp. como participante da interação, como para verificar seu valor.

Os MMPs sempre foram considerados como microrganismos encontrados em

ambientes anaeróbicos ricos em sulfeto (BAZYLINSKI *et al.*, 1990; FARINA *et al.*, 1990; BAZYLINSKI *et al.*, 1995; PÓSFAL *et al.*, 1998). As camadas de sedimentos em que “*Ca. M. multicellularis*” foram encontrados apresentam essas mesmas características (ABREU *et al.*, 2007). Simmons *et al.* (2004) sugeriram que os MMPs são microrganismos que vivem em gradientes e que sua localização no sedimento pode estar relacionada a presença de compostos de ferro ou enxofre, e não diretamente a concentração de oxigênio. A observação da relação ecológica entre MMPs e *Pseudoalteromonas* sp., que é descrita como aeróbica, indica que os MMPs ao menos freqüentam regiões do sedimento contendo oxigênio, sendo então tolerantes ao gás.

Outro resultado que sugere a tolerância dos MMPs ao oxigênio é o fato de os nMMPs não desagregarem tão facilmente quanto os MMPs durante a observação ao microscópio óptico. Os nMMPs são capazes de permanecer viáveis por horas sendo observados ao microscópio óptico, no entanto, eles saem do campo de observação que assim que iluminados. Já os MMPs são mantidos no campo de observação com o auxílio de um campo magnético aplicado e microrganismos desagregando são detectadas em questão de minutos. Assim, a desagregação parece ser um resultado da iluminação direta dos microrganismos, e não da exposição ao oxigênio. A comparação entre o comportamento dos nMMPs e MMPs e a existência da relação ecológica entre MMPs e uma bactéria aeróbica indica que os MMPs são, pelo menos, aerotolerantes.

5.4 Relações intercelulares e de possíveis estruturas envolvidas na manutenção da forma das células e organização multicelular de “*Ca. M. multicellularis*”

O estudo da morfologia celular, adesão e polaridade das células em “*Ca. M. multicellularis*” é extremamente interessante porque a organização das células em uma esfera parece ser pré-requisito para a sua sobrevivência. A ultraestrutura dos MMPs tem sido estudada desde sua descoberta. Rodgers *et al.* (1990) mostrou que as células individuais do microrganismo são conectadas pela membrana externa através de uma estrutura semelhante a junções. Lins & Farina (1999) também descreveram regiões de adesão entre as células. Infelizmente, não foram encontradas evidências claras da presença de estruturas responsáveis pelas junções celulares, que seriam de grande importância para a organização

multicelular do microrganismo.

Os resultados obtidos através da citoquímica de Thiery sugerem que a camada de polissacarídeos encontrada entre as células pode ser a responsável por manter as células unidas, mantendo-as organizadas de forma polarizada. O estudo da permeabilidade celular usando o corante fluorescente Lucifer yellow (Sigma) mostrou que ela não promove o isolamento do compartimento interno em relação ao ambiente externo. No entanto, a região de contato entre as células não é permeável a qualquer tipo de molécula, uma vez que existe uma limitação espacial promovida pela adesão entre as células.

As citoquímicas para detecção de estruturas contendo cálcio mostraram resultados diferentes que podem estar relacionados à sensibilidade da técnica ou as condições da amostra, uma vez que não se trata de cultura pura, mas sim de um enriquecimento a partir de uma amostra ambiental. Além de as técnicas de citoquímica terem sido desenvolvidas para estudo de células eucarióticas. A técnica do piroantimoniato de potássio mostrou a presença de diversos precipitados elétrons densos na superfície celular e na região de adesão entre as células, sugerindo a existência de moléculas com capacidade de ligar cálcio como bombas de íons, proteínas ligadoras de cálcio, canais de cálcio e moléculas de adesão celular. A existência de precipitados entre as células e o fato de as células de "*Ca. M. multicellularis*" desagregarem na presença de EGTA, sugerem fortemente que moléculas de adesão dependentes de cálcio devem estar envolvidas na organização multicelular do microrganismo.

A citoquímica que visa à preservação de sítios de afinidade por cálcio, também mostrou uma estrutura possivelmente ligada à adesão celular ocupando região semelhante à descrita por Keim *et al.* (2004a) na descrição da existência de projeções laterais entre células quando observadas pela técnica de criofratura. No entanto, há necessidade de se utilizar técnicas que permitem melhor preservação da amostra, como congelamento sob alta pressão seguido de substituição a frio, freeze-etching ou microscopia eletrônica de seções vítreas para eliminar a possibilidade de artefato, uma vez que o observado pela citoquímica pode ter sido causado por uma retração da membrana celular que, inclusive, não está evidente. Essa citoquímica permitiu a melhor observação de uma estrutura estriada localizada próxima às cadeias de magnetossomos. Como as bactérias magnetotáticas apresentam um filamento de uma proteína homóloga a actina responsável seu

alinhamento em cadeia, essa estrutura pode ter função semelhante e, talvez, composição similar. Estruturas desse tipo foram observadas em "*Chlorochromatium aggregatum*", no entanto ela apresentava 35 nm de espessura e até 1 µm de comprimento, sendo denominada cristais bacterianos centrais. O consórcio fototrófico "*Chlorochromatium aggregatum*" é uma associação de bactérias verdes sulfurosas que se organizam em torno de uma bactéria móvel e quimiotrófica, representando uma associação multicelular. A possível função dos cristais bacterianos centrais seria a participação na interação célula-célula nas associações multicelulares (WANNER, VOGL & OVERMANN, 2008). No entanto, através da reconstrução tridimensional da estrutura estriada em "*Ca. M. multicellularis*" foi possível observar que ela se estende ao longo da célula como uma espécie de placa, e não está ligada a membrana celular na maioria das células. Assim seu papel na interação entre as células parece duvidoso. A participação dessa estrutura estriada na organização e divisão dos magnetossomos parece menos improvável, mas não deixa de ser duvidosa devido ao fato de não estar muito próxima a eles, isto é, ligadas à eles. Outra possibilidade relacionada à função dessa estrutura na célula é que ela possa ser receptores quimiotáticos. Esses receptores já foram descritos para diversas bactérias (BRIEGEL *et al.*, 2009) e sendo receptores quimiotáticos justificaria sua presença tanto em "*Ca. M. multicellularis*" como em "*Chlorochromatium aggregatum*".

Infelizmente não foi possível determinar a localização das proteínas de citoesqueleto FtsZ e MreB como pretendido inicialmente. No entanto, a amplificação desses genes utilizando amostras enriquecidas em "*Ca. M. multicellularis*" mostrou que essas proteínas fazem parte do citoesqueleto das células do microrganismo e estão diretamente relacionadas à divisão celular e determinação da forma das células do microrganismo. No caso de MreB, homóloga a actina, é possível que ela desempenhe algum papel na organização multicelular do microrganismo, pois, em eucariotos, a actina associada a caderinas, moléculas que promovem a adesão célula-célula de forma dependente de íons Ca^{2+} (IVANOV, PHILIPPOVA & TKACHUK, 2001), são responsáveis pela condensação e compactação de células epiteliais em formas de cisto esféricos (GUMBINER, 1996). Porém o papel de MreB na formação multicelular do microrganismo só poderá ser avaliada a partir da determinação da distribuição da proteína nas células. A análise filogenética de ambas as proteínas confirma a localização do microrganismo na classe

Deltaproteobacteria, e a comparação desses genes em outros MMPs pode ser usada na distinção entre espécies na análise de seqüência multilocus. Esse tipo de análise seria interessante uma vez que os MMPs possuem grande diversidade, incluindo até mesmo os nMMPs. Assim seria possível a separação de espécies de MMPs, como é utilizada no estudo da diversidade de bacterias do gênero *Vibrio*, *Bartonella* e *Wolbachia* (CANO-GÓMEZ *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2008 ; ROS *et al.*, 2009).

A reconstrução de metade de um “*Ca. M. multicellularis*” mostrou que as células que formam o microrganismo possuem formatos similares, mas não idênticos, e tamanhos variados, o que pode significar diferentes estágios de crescimento. Durante a observação dos cortes seriados para obtenção de imagens para a reconstrução tridimensional foi possível notar que a divisão sincronizada não era um evento freqüente na amostra. O fato de as células possuírem formas e tamanhos diferentes e de que a divisão sincrônizada nem sempre era observada sugere que não existe um mecanismo que controle a divisão celular no microrganismo como um todo. Talvez o que ocorra é que, pelas células estarem expostas as mesmas condições ambientais e por serem geneticamente idênticas (KEIM *et al.*, 2004b), coincidam os momentos de sua divisão.

Os resultados apresentados nesse trabalho e em Silva (2008) sugerem que o fator responsável pela constrição ocorrida durante o ciclo de vida exclusivamente multicelular de “*Ca. M. multicellularis*” seria a pressão gerada nas regiões de adesão entre as células devido ao aumento do volume das células, sua divisão e conseqüente aumento do volume do microrganismo. Conforme as células vão crescendo e aumentando seu volume a força necessária para manter as células unidas também aumenta, isso exige que a adesão entre as células seja maior. No entanto, deve existir um limite suportado pelas moléculas de adesão. Certamente deve existir uma pequena variação nesse limite suportado para cada contato celular, o que levaria a ruptura em um local específico, e, então a maneira mais estável de organização das células nessa nova situação seria um movimento circular para dentro do microrganismo, representado pela forma de oito nas últimas etapas do ciclo. O contínuo crescimento das células e/ou divisões celulares poderiam levar a separação dos organismos-filhos.

6. Conclusões

- As bactérias magnetotáticas podem ser encontradas em ambientes extremos. Novos representantes do grupo de bactérias magnetotáticas foram descritos em ambientes extremos, sendo eles:
 - HSMV-1, vibrião pertencente ao filo *Nitrospira*, encontrados em ambientes cuja temperatura varia de 32 a 63° C;
 - BW-1, bastonete produtor de greigita, pertencente à classe Deltaproteobacteria;
 - BW-2, bastonete pertencente à classe Gammaproteobacteria, produtor de magnetita;
 - Três espécies de cocos magnetotáticos encontrados em ambientes costeiros da Antártica.
- Procariotos multicelulares semelhantes aos MMPs, porém não magnetotáticos, não haviam sido descritos até o momento. nMMPs são morfológica e filogeneticamente semelhantes aos MMPs, indicando que os genes relacionados a formação de magnetossomos de sulfeto de ferro também possam fazer parte de uma ilha genômica e serem compartilhados entre espécies por transferência lateral de genes;
- A comparação dos genes que codificam as proteínas de citoesqueleto FtsZ e MreB entre diferentes MMPs e até mesmo nMMPs pode ser útil na distinção das diferentes espécies;
- A organização celular em “*Ca. M. multicellularis*” parece ser promovida por carboidratos na superfície das células que tenham a capacidade de se ligar a cálcio ou pela ação dos carboidratos da superfície da célula e moléculas de adesão celular dependente de cálcio;
- A estrutura estriada encontrada na célula de “*Ca. M. multicellularis*” é contínua na célula, formando uma espécie de placa e seu tamanho é proporcional ao celular;
- A divisão celular em “*Ca. M. multicellularis*” não é atípica, ocorrendo no menor eixo da célula e simetricamente;
- A forma das células de “*Ca. M. multicellularis*” são semelhantes, mas não idênticas e parecem depender do contato com as células vizinhas;

- Os mesmos fatores responsáveis pela organização multicelular no microrganismo parecem ter essencial função no ciclo de vida exclusivamente multicelular de "*Ca. M. multicellularis*".

7. Referências bibliográficas

- ABREU, F. **Filogenia e viabilidade celular em organismos multicelulares magnetotáticos.** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 83p., 2006.
- ABREU, F., MARTINS, J.L., SILVEIRA, T.S., KEIM, C.N., LINS DE BARROS, H.G.P., GUEIROS-FILHO, F. & LINS, U. '**Candidatus Magnetoglobus multicellularis**', a multicellular magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1318-1322, 2007.
- ABREU, F., SILVA, K.T., FARINA, M., KEIM, C. & LINS, U. **Greigite magnetosome membrane ultrastructure in *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*.** *Intern. Microbiol.*, 11, 75-80, 2008.
- ABREU, F., SILVA, K.T., MARTINS, J.L. & LINS, U. **Cell viability in magnetotactic multicellular prokaryotes.** *Int. Microbiol.* 9, 267-272, 2006.
- ALMEIDA, F.P. **Comportamento e motilidade da bactéria magnetotática "*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*" sob campo magnético aplicado.** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 106 p., 2009.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. **Basic local alignment search tool.** *J. Mol. Biol.* 215:403-410,1990.
- AMANN, R., PEPLIES J. & SCHÜLER, D. **Diversity and taxonomy of magnetotactic bacteria,** p. 25–36. In D. Schüler (ed.), *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*, vol. 3. Springer, Heidelberg, Germany, 2007.
- ARAKAKI, A., NAKAZAWA, H., NEMOTO, M., MORI, T. & MATSUNAGA, T. **Formation of magnetite by bacteria and its application.** *J. R. Soc. Interface.* 26, 977-99, 2008.
- ARATÓ, B., SZÁNYI, Z., FLIES, C., SCHÜLER, D., FRANKEL, R.B., BUSECK, P.R. & PÓSFAL, M. **Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker.** *Am. Mineral.* 90, 1233-1241, 2005.
- BALKWILL, D.L., MARATEA, D. & BLAKEMORE, R.P. **Ultrastructure of a magnetotactic spirillum.** *J. Bacteriol.*, 141, 1399-1408, 1980.
- BAZYLINSKI, D. A. & FRANKEL, R. B. **Biologically Controlled Mineralization in Prokaryotes.** *Rev. Mineral. Geochem.*, 54, 217-247, 2003.
- BAZYLINSKI, D. A. & SCHÜBBE, S. **Controlled biomineralization by and applications of magnetotactic bacteria.** *Adv. Appl. Microbiol.*, 62, 21–62, 2007.
- BAZYLINSKI, D. A., FRANKEL, R. B. & JANNASCH, H. W. **Anaerobic magnetite production by a marine, magnetotactic bacterium.** *Nature*, 334, 518-519, 1988.
- BAZYLINSKI, D.A. & FRANKEL, R.B. **Magnetosome formation in prokaryotes.** *Nature Rev. Microbiol.*, 2, 217-230, 2004.
- BAZYLINSKI, D.A. **Synthesis of the bacterial magnetosome: the making of a magnetic personality.** *Int. Microbiol.*, 2,71-80,1999.
- BAZYLINSKI, D.A., & WILLIAMS, T.J. **Ecophysiology of magnetotactic bacteria.** In: **Magnetoreception and Magnetosomes in bacteria.** Vol. 3. Schüler, D. (ed). Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 37-75, 2007.

BAZYLINSKI, D.A., FRANKEL R.B., GARRATT-REED, A.J. & MANN, S. **Biomining of iron sulfides in magnetotactic bacteria from sulfidic environments.** In: Frankel RB, Blakemore RP (eds) Iron biominerals. Plenum, New York, p 239–255, 1990.

BAZYLINSKI, D.A., FRANKEL, R.B., HEYWOOD, B.R., MANN S., KING, J.W., DONAGHAY P.L. & HANSON, A.K. **Controlled biomineralization of magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) in a magnetotactic bacterium.** Appl. Environ. Microbiol., 61, 3232-3239, 1995.

BAZYLINSKI, D.A., HEYWOOD, B.R., MANN, S. & FRANKEL, R.B. **Fe₃O₄ and Fe₃S₄ in a bacterium.** Nature, 366, 218, 1993.

BAZYLINSKI, D.A., SCHLEZINGER, D.R., HOWES, B.H., FRANKEL, R.B., & EPSTEIN, S.S. **Occurrence and distribution of diverse populations of magnetic protists in a chemically stratified coastal salt pond.** Chem Geol 169, 319–328, 2000.

BENCHIMOL, M. **Localização de Cálcio.** Em: Wanderley de Souza (ed.) Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas, Rio de Janeiro-Sociedade Brasileira de Microscopia, p. 80-83, 1998.

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

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

BRIEGEL, A., ORTEGAC, D.R., TOCHEVAA, E.I., WUICHETD K., LIA, Z., CHENA, S., MULLERE, A., IANCUA, C. V., MURPHYA, G.E., DOBROA M. J., ZHULIND, I.B. & JENSENA, G.J. **Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays.** PNAS 106, 17181-17186, 2009.

CANO-GOMEZ, A., GOULDEN, E.F., OWENS, L. & HØJ, L. **Vibrio owensii sp.nov., isolated from cultured crustaceans in Australia.** FEMS Microbiol. Lett., 302, 175–181, 2010.

COLE, J. R., Q. WANG, E. GARDENAS, J. FISH, B. CHAI, R. J. FARRIS, A. S. KULAM-SYED-MOHIDEEN, D. M. MCGARRELL, T. MARSH, G. M. GARRITY, & J. M. TIEDJE. **The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis.** Nucleic Acids Res., 37, 141-D145, 2009.

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

EDER, W., LUDWIG, W. & HUBER, R. **Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrit Deep, Red Sea.** Arch. Microbiol., 172, 213-218, 1999.

FAIVRE, D. & D. SCHÜLER. **Magnetotactic bacteria and magnetosomes.** Chem. Rev. 108, 4875-4898, 2008.

FARINA, M., ESQUIVEL, D. M. & LINS DE BARROS, H. G. **Magnetic iron-sulfur crystals from a magnetotactic microorganism.** Nature, 343, 256-258, 1990.

FARINA, M., KACHAR, B., LINS, U., BRODERIK, R. & LINS DE BARROS, H.P. **The observation of large magnetite (Fe₃O₄) crystals from magnetotactic bacteria by electron and atomic force microscopy.** J. Microsc., 173, 1-8, 1994.

FARINA, M., LINS DE BARROS, H, ESQUIVEL, D.M.S. & DANON, J. **Ultrastructure of a magnetotactic microorganism.** Biol. Cell, 48, 85-88, 1983.

FASSBINDER, J.W.E., STANJEK, H. & VALI, H. **Occurrence of magnetic bacteria in soil.** Nature, 343, 161-162, 1990.

FIALA, J.C. **Reconstruct: a free editor for serial section microscopy.** J. Microsc., 218, 52-61, 2005.

FLIES, C.B., PEPLIES, J. & SCHULER, D. **Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments.** Appl. Environ. Microbiol., 71, 2723-2731, 2005.

FRANKEL, R. B., WILLIAMS, T. J., & BAZYLINSKI, D. A. **Magneto-aerotaxis.** In “**Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria**” . D. Schüler, ed., Vol. 3, pp. 1–24. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007.

FRANKEL, R.B., BAZYLINSKI, D.A., JOHNSON, M.S. & TAYLOR, B.L. **Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria.** Biophys. J., 73, 994-1000,1997.

GAUTHIER, G., GAUTHIER, M. & CHRISTEN, R. **Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas*(emended) and *Pseudoalteromonas gen. nov.*, and proposal of twelve new species combinations.** Int J Syst Bacteriol 45,755-761, 1995.

GEELHOED, J.S., SOROKIN, D.Y., EPPING, E., TOUROVA, T.P., BANCIU, H.L., MUYZER, G., STAMS, A.J.M. & VAN LOOSDRECHT, M.C.M. **Microbial sulfide oxidation in the oxic–anoxic transition zone of freshwater sediment: involvement of lithoautotrophic *Magnetospirillum* strain J10.** FEMS Microbiol. Ecol., 70, 54-65, 2009.

GLEICH, B. & WEIZENECKER, R. **Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles.** Nature 435, 1214–1217, 2005.

GORBY, Y.A., BEVERIDGE, T.J & BLAKEMORE, R.P. **Characterization of bacterial magnetosome membrane.** J. Bacteriol., 170,834-841,1988.

GREENBERG, M., CANTER, K., MAHLER, I. & TORNHEIM, A. **Observation of magnetoreceptive behavior in a multicellular magnetotactic prokaryote in higher than geomagnetic fields.** Biophys. J., 88, 1496-1499, 2005.

GRÜNBERG, K., MÜLLER, E.C., OTTO, A., RESZKA, R., LINDER, D., KUBE, M., REINHARDT, R. & SCHÜLER, D. **Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*.** Appl. Environ. Microbiol., 70, 1040-1050, 2004.

GUMBINER, B.M. **Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis.** Cell, 84, 345–357, 1996.

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

IVANOV, D.B., PHILIPPOVA, M.P. & TKACHUK, V.A. **Structure and Functions of Classical Cadherins.** Biochemistry, 66, 1174-1186, 2001.

JOGLER C., LIN W., MEYERDIERKS A., KUBE M., KATZMANN E., FLIES C., PAN Y., AMANN R., REINHARDT R. & SCHÜLER, D. **Toward cloning of the magnetotactic metagenome: identification of magnetosome island gene clusters in uncultivated magnetotactic bacteria from different aquatic sediments.** Appl. Environ. Microbiol., 75, 3972-3979, 2009b.

JOGLER, C., KUBE M., SCHÜBBE S. , ULLRICH S. , TEELING H., BAZYLINSKI D. A., REINHARDT R. & SCHÜLER D. **Comparative analysis of magnetosome gene clusters in magnetotactic bacteria provides further evidence for horizontal gene transfer.** Environ. Microbiol., 15, 1267-1277, 2009a.

JOGLER, C., & SCHÜLER, D. **Genetic analysis of magnetosome biomineralization.** In “**Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria**”. D. Schüler, ed., Vol. 3, pp. 133–161. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007.

JUHAS M., VAN DER MEER J.R., GAILLARD M., HARDING R.M., HOOD D.W., & CROOK D.W.

Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS Microbiol. Rev. 33, 376–393, 2009.

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

KEIM, C. N., MARTINS, J. L., LINS DE BARROS, H.P.; LINS, U. & FARINA, M. **Structure, behavior, ecology and diversity of multicellular magnetotactic prokaryotes.** In: Dirk Schüler. (Org.). Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria. Berlin - Heidelberg: Springer, p. 103-132, 2007.

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

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

KIRSCHVINK, J.L. **South-seeking magnetic bacteria.** J. Exp. Biol. 86, 345-347, 1980.

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

KOMEILI A., VALI H., BEVERIDGE T. J. & NEWMAN D. K. **Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 3839–3844, 2004.

LANE, D. J. **16S/23S rRNA sequencing,** In E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom., p.115-175, 1991.

LEFÈVRE C., BERNADAC A., PRADEL N., WU L. , YU-ZHANG K., XIAO T., YONNET JP., LÉBOUC A., SONG T. & FUKUMORI, Y. **Characterization of Mediterranean magnetotactic bacteria.** J. Ocean. Univ. China, 6, 5 – 9, 2007.

LIN, J.W, CHEN, C.Y., CHEN, W.C., CHOMEL, B.B. & CHANG, C.C. **Isolation of *Bartonella* species from rodents in Taiwan including a strain closely related to '*Bartonella rochalimae*' from *Rattus norvegicus*.** J. Med. Microbiol., 57, 1496–1501, 2008.

LINS U., KEIM C.N., EVANS F.F., FARINA M. & BUSECK P.R. **Magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃S₄) crystals in magnetotactic multicellular organisms.** Geomicrobiol. J., 24, 43-50, 2007.

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

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

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

MAI-PROCHNOW, A., EVANS, F., DALISAY-SALUDES, D., STELZER, S., EGAN, S., JAMES, S., WEBB, J.S. & KJELLEBERG, S. **Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*.** Appl. Environ. Microbiol. 70, 3232–3238, 2004.

MANN, S., SPARKS, N. H. C., FRANKEL, R. B., BAZYLINSKI, D. A. & JANNASCH, H. W. **Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium.** Nature, 343, 258-261, 1990.

- MARATEA, D. & BLAKEMORE, R.P. ***Aquaspirillum magnetotacticum* sp. nov. a magnetic spirillum.** Int. J. Syst. Bacteriol., 31: 452-455, 1981.
- MARTINS J.L., SILVEIRA, T.S.; ABREU F.; SILVA K.T.; SILVA-NETO I.D. & LINS, U. **Grazing protozoa and magnetosome dissolution in magnetotactic bacteria.** Environ. Microbiol., 9: 2775–2781, 2007.
- MARTINS, J. L., SILVEIRA, T. S., SILVA, K. T. & LINS U. **Salinity dependence of the distribution of multicellular magnetotactic prokaryotes in a hypersaline lagoon.** Int. Microbiol., 12, 193-201, 2009.
- MATSUNAGA T & SAKAGUCHI T. **Molecular mechanism of magnet formation in bacteria.** J. biosci. bioeng., 90, 1-13, 2000.
- MELDRUM, F.C., HEYWOOD, B.R., MANN, S., FRANKEL, R.B. & BAZYLINSKI, D.A. **Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium.** Proc. R. Soc. London, 251, 231-236, 1993.
- MILTENYI, S., MULLER, W., WEICHEL, W. & RADBRUCH, A. **High-gradient magnetic cell-separation with macs.** Cytometry 11, 231–238, 1990.
- MURPHY, D.B. **Light and color.** Em: Douglas B. Murphy (ed.) Fundamentals of light microscopy and electronic imaging, EUA, Wiley-Liss, Inc., p. 15-28, 2001.
- PERNTHALER, J., GLÖCKNER F. O., SCHÖNHUBER W. & AMANN R. **Fluorescence *in situ* hybridization.** In J. Paul (ed.), Methods in Microbiology: Marine Microbiology, vol. 30, Academic Press Ltd, London, 2001.
- PLANK, C., SCHILLINGER, U., SCHERER, F., BERGEMANN, C., REMY, J. S., KROTZ, F., ANTON, M., LAUSIER, J. & ROSENECKER, J. **The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery.** Biol. Chem. 384, 737–747, 2003.
- PÓSFAL, M., BUSECK, P. R., BAZYLINSKI, D. A. & FRANKEL, R. B. **Iron sulfides from magnetotactic bacteria: structure, composition, and phase transitions.** Am. Mineral., 83, 1469-1481, 1998.
- RASBAND, W.S., **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009.
- RITCHER M., KUBE M., BAZYLINSKI D.A., LOMBARDOT T., GLÖCKNER F.O., REINHARDT R. & SCHÜLER D. **Comparative genome analysis of four magnetotactic bacteria reveals a complex set of group-specific genes implicated in magnetosome biomineralization and function.** J. Bacteriol., 189, 4899-4910, 2007.
- RODGERS, F. G., BLAKEMORE, R. P., BLAKEMORE, N. A., FRANKEL, R. B., BAZYLINSKI, D. A., MARATEA, D. & RODGERS, N. **Intercellular structure in a many-celled magnetotactic prokaryote.** Arch. Microbiol., 154, 18-22, 1990.
- ROS, V.I.D., Fleming, V.M., Feil, E.J. & Breeuwer, J..A.J. **How Diverse Is the Genus Wolbachia? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New Wolbachia Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae).** Appl. Environ. Microbiol, 75 , 1036–1043, 2009.
- ROSE, T.M., HENIKOFF, J.G. & HENIKOFF, S. **CODEHOP (CONsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design.** Nucleic Acids Res.,31, 3763-3766, 2003.
- SAITOU, N. & NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Mol. Biol. Evol., 4, 406-425, 1987.
- SAKAGUCHI, T., ARAKAKI, A. & MATSUNAGA, T. ***Desulfovibrio magneticus* sp.nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain magnetite particles.** Int. J.

Syst. Bacteriol., 52, 215-221, 2002.

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

SCHEFFEL A., GRUSKA M., FAIURE D., LINAROUDIS A., PLITZKO J.M. & SCHÜLER D. **An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria.** Nature, 440,110–115, 2006.

SCHÜBBE S., KUBE M., SCHEFFEL A., WAWER C., HEYEN U. , MEYERDIERKS A., MADKOUR M. H.,MAYER F., REINHARDT R. & SCHÜLER D. **Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island.** J. Bacteriol., 185, 5779-5790, 2003.

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

SHINODA, Y., Y. SAKAI, M. UE, A. HIRAIISHI & N. KATO. **Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol.** Appl. Environ. Microbiol. 66:1286–1291, 2000.

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

SILVA, K. T., ABREU, F., KEIM, C., FARINA, M. & LINS, U. **Ultrastructure and cytochemistry of lipid granules in the many-celled magnetotactic prokaryote *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*.** Micron (Oxford), 39, 1387-1392, 2008.

SILVA, K.T. **Distribuição de magnetossomos em “*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*”.** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 71p., 2008.

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

SIMMONS, S.L., BAZYLINSKI, D.A., & EDWARDS, K.J. **Population dynamics of marine magnetotactic bacteria in a meromictic salt pond described with qPCR.** Environ. Microbiol. 9, 2162-2174,2007.

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

SOUZA, W. **Citoquímica de carboidratos.** Em: Wanderley de Souza (ed.) Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas, Rio de Janeiro-Sociedade Brasileira de Microscopia, p. 66-73, 1998.

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

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

SUKUMARAN, P. V. **Magnetotactic bacteria, magnetofossils and antiquity of life.** Curr. Sci., 88, 879–885, 2005.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M & KUMAR S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** Mol. Biol. Evol., 24, 1596-1599, 2007.

THOMAS, T., EVANS, F. F., SCHLEHECK, D., MAI-PROCHNOW, A., BURKE, C., PENESYAN, A., DALISAY, D.S., STELZER-BRAID,S., SAUNDERS,N., JOHNSON,J., FERRIERA,S., KJELLEBERG, S. & EGAN, S. **Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicata* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment.** PLoS ONE, 3252, 1-10, 2008.

TORRES DE ARAUJO, F. F., PIRES, M. A., FRANKEL, R. B. & BICUDO, C. E. M. **Magnetite and magnetotaxis in algae.** Biophys. J. 50:375-378, 1986.

ULRICH S., KUBE M., SCHÜBBE S., REINHARDT R. & SCHÜLER D. **A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth.** J. Bacteriol., 187, 7176–7184, 2005.

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

WANNER, G., VOGL, K. & OVERMANN, J. **Ultrastructural Characterization of the Prokaryotic Symbiosis in "*Chlorochromatium aggregatum*".** J. Bacteriol. 190, 3721-3730, 2008.

WENTER R., WANNER G., SCHÜLER D. & OVERMANN J. **Ultrastructure, tactic behaviour and potential for sulfate reduction of a novel multicellular magnetotactic prokaryote from North Sea sediments.** Environ. Microbiol. 11,1493-1505, 2009.

WINKLHOFER, M., ABRAC, ADO, L. G., DAVILA, A. F., KEIM, C. N. & LINS DE BARROS, H. G. P. **Magnetic optimization in a multicellular magnetotactic organism.** Biophys. J. 92, 661–670, 2007.

WOLFE, R. S., THAUER, R. K., PFENNIG, N. **A “capillary racetrack” method for isolation of magnetotactic bacteria.** FEMS Microbiol. Ecol. 45, 31–35, 1987.

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](#)