

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL E
BIOPROCESSOS

Dissertação de Mestrado



LIGIA MASSA BACELLAR MENDES

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS MAGNETOTÁTICAS DO CANAL DE CABO
FRIO, RJ, BRASIL**

RIO DE JANEIRO

2023

Ligia Massa Bacellar Mendes

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS MAGNETOTÁTICAS DO CANAL DE CABO
FRIO, RJ, BRASIL

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientadora: Fernanda de Avila Abreu

Rio de Janeiro

2023

Ficha Catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

M414b Massa Bacellar Mendes, Lígia
Bioprospecção de Bactérias Magnetotáticas do
Canal de Cabo Frio, RJ, Brasil / Lígia Massa
Bacellar Mendes. -- Rio de Janeiro, 2023.
92 f.

Orientador: Fernanda De Avila Abreu.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da
Saude, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Vegetal, 2023.

1. Bioprospeção. 2. Bactérias Magnetotáticas. 3.
Biodiversidade. 4. Cultivo. 5. Biotecnologia. I. De
Avila Abreu, Fernanda, orient. II. Título.

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



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

**ATA DE DEFESA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LIGIA MASSA BACELLAR MENDES
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).**

Aos vinte e nove dias do mês de setembro de dois mil e vinte e três, às 13 horas, reuniu-se na Sala de Reuniões do Departamento de Microbiologia, subsolo Bloco I do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a Banca Examinadora abaixo discriminada para avaliação da Dissertação de Mestrado da aluna **Ligia Massa Bacellar Mendes** intitulada "Bioprospecção de Bactérias Magnetotáticas do Canal de Cabo Frio, RJ, Brasil", desenvolvida sob a orientação da **Profª. Fernanda de Ávila Abreu**. A apresentação feita pela candidata foi acompanhada da arguição pelos componentes da Banca. Em seguida, esta se reuniu para sua avaliação e a defesa foi considerada () (inserir letra apropriada).

- A) Aprovado;
- B) Aprovado com pequenas modificações* a serem combinadas com o Presidente da Banca dentro de um mês;
- C) Não aprovado ainda, é necessária a apresentação das modificações/correções* em uma nova versão do documento para o Presidente da Banca e uma carta do Presidente com prazo de máximo 3 meses para ser aprovada; se não reprovada
- D) Não aprovado ainda, é necessária uma nova apresentação*, oral e escrita, para a mesma ou nova banca examinadora dentro de um prazo combinado com a comissão do Programa.
- E) Reprovado, razões da reprovação* escritas no espaço destinado.

*As modificações/correções/razões para reprovação precisam ser discriminadas e o Presidente da Banca e o(a) aluno(a) precisam estar cientes.

E, para constar, foi lavrada a presente ata que vai devidamente assinada pelo coordenador, pelos membros da Banca Examinadora, pelo Presidente da Banca Examinadora e pela orientadora da aluna, que ficará com uma via da ata e entregará outra para a secretaria do PBV.

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2023.

Centro de Ciências da Saúde – Bloco K
Sala K2-032 – 2º andar – Cidade Universitária
CEP: 21941-590 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil
Tel: +552139386676 - E-mail: pbv@ccsdecania.ufrj.br

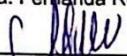


Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde

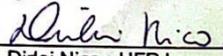
Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal
e Bioprocessos

**ATA DE DEFESA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de Ligia Massa Bacellar Mendes
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre
em Ciências (Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos).**

Dra. Fernanda Reinert Thomé Macrae – Coordenadora



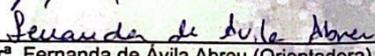
Dr^a. Alané Beatriz Vermelho - UFRJ



Dr^a. Dirlei Nico - UFRJ



Dr. Vinicius Ferruzzi de Oliveira – UFRJ

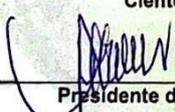


Dr^a. Fernanda de Ávila Abreu (Orientadora)

Ligia Massa Bacellar Mendes (Mestranda)

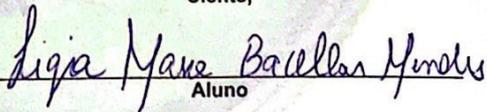
LISTA DE MODIFICAÇÕES, CORREÇÕES OU RAZÕES PARA REPROVAÇÕES:

Ciente,



Presidente da Banca

Ciente,



Aluno

Centro de Ciências da Saúde – Bloco K
Sala K2-032 – 2º andar – Cidade Universitária
CEP: 21941-590 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil
Tel: +552139386676 - E-mail: pbv@ccsdecania.ufrj.br

*Dedico este trabalho aos curiosos por natureza,
aos cientistas de corpo e alma e a todas as pessoas que contribuíram
para que eu chegasse até aqui. Muitos não tiveram
a oportunidade de estudar em uma Universidade Federal.*

Agradecimentos

Chegar ao fim do meu mestrado na Universidade Federal do Rio de Janeiro é motivo de muito orgulho. Foi um caminho longo, mas que se encurtou na mesma proporção em que recebi apoio. Passou rápido. Aprendi muito. Os grandes responsáveis por essa conquista são meus pais maravilhosos. São seres humanos empáticos, criativos, sonhadores, racionais, responsáveis, sensíveis, justos e cheios de caráter. Sempre me incentivando a ir mais longe, pois é assim que o ser humano consegue, verdadeiramente, se encontrar. Mãe, Isabella e pai, Leonardo, devo tudo a vocês.

Agradeço à minha irmã Manuella por todos os nossos momentos de parceria infinita, pelas risadas, pelo seu amor. À minha avó Hercília por sempre cuidar de mim por muitos anos aqui na Terra e por continuar sua vigilância no plano espiritual. Nosso amor é eterno e vem de outras vidas. Ao meu avô Sylvio, pelo cuidado, carinho, conhecimentos infinitos, histórias homéricas, risadas e admiração.

Agradeço ao meu amor Matheus, por ter acompanhado de perto minha caminhada na pós-graduação sempre com palavras doces, recheadas de incentivo. Com você sou mais forte. Obrigada pela sua torcida permanente e por todas as nossas trocas. Eu te amo! Agradeço à Bib's e ao Guilherme, casal de amigos que torcem muito por mim e são parceiros pra vida toda! Luísa, Thales e Luís Felipe, amigos da graduação maravilhosos que estão voando alto, obrigada queridos, pelo apoio, carinho e por dividirem seus pensamentos sobre a pós-graduação comigo.

O mestrado pelo PBV foi uma oportunidade única. Ímpar. Saí da zona de conforto, pude trabalhar e aprender sobre uma área do conhecimento totalmente nova. Serei eternamente grata à minha orientadora Professora Fernanda de Avila Abreu por ter depositado, energia, apoio, palavras de incentivo, clareza, e confiança na nossa parceria. Obrigada por ter acreditado em mim e pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório em um período marcado por uma crise na saúde global, repleto de incertezas, desafios e surpresas que enfrentamos ao longo da nossa jornada de dois anos. Fernanda é uma professora maravilhosa que tem muito orgulho de seus alunos. Foi um privilégio ter participado da sua equipe.

Agradeço por ter sido muito bem acolhida e respeitada pelos colegas do LabMax que me ajudaram muito nessa transição do mundo macro para o micro. Em especial aos colegas Igor, Mariana, Bia, Eduardo, Juliana e Rogerio. Igor, obrigada mil vezes. Você é um verdadeiro professor. Aprendi muito contigo, obrigada pela sua paciência, empatia e escuta atenta. Você é gigante, te admiro profundamente.

Agradeço ao Jefferson Cypriano e à Professora Dirlei Nico pelas nossas conversas divertidíssimas. Me senti muito acolhida por vocês. Jefferson muito obrigada pelo seu apoio incessante. Sem você eu não teria aprendido nem 1% do que sei agora sobre microscopia. Obrigada por ter me ajudado tanto nos microscópios e obrigada pela ajuda com as figuras da minha dissertação. Dirlei, obrigada por ser tão calma, sensível, madura e empática. Vocês são professores incríveis.

Agradeço a FAPERJ e CAPES pelo fomento às atividades de pesquisa. Agradeço a UFRJ, CCS e ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes. Sou grata pela utilização de toda infraestrutura bem como o apoio de todo o corpo docente e técnico do Instituto de Microbiologia e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Agradeço a UNIMICRO e ao CBPF por toda infraestrutura e apoio técnico pela obtenção das imagens de microscopia.

Resumo

Mendes, Ligia Massa Bacellar. Bioprospecção de bactérias magnetotáticas do Canal de Cabo Frio, RJ, Brasil. Rio de Janeiro, 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Bactérias magnetotáticas (BMs) consistem num grupo de bactérias Gram-negativas que apresentam uma grande diversidade em relação à morfologia, metabolismo e história evolutiva. BMs são microaerófilas ou anaeróbias e são encontradas em sedimento de ambientes aquáticos, colunas de água estratificadas e solos alagados. Esse grupo de bactérias possui a capacidade de sintetizar nanopartículas magnéticas, denominadas magnetossomos através da biomineralização, processo controlado em nível genético por genes específicos. Os magnetossomos lhes conferem a capacidade de se moverem alinhadas não só na direção do campo magnético terrestre, mas também na direção de campos magnéticos induzidos. Estas propriedades deste grupo de bactérias fornecem-lhes características únicas que podem ser aproveitadas e com aplicabilidade em diversas aplicações biotecnológicas. BMs afiliadas aos filos Proteobacteria (dentro das classes Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- e *Ca. Etaproteobacteria*), Nitrospirae e Candidatus Omnitrophica foram descritos nos últimos anos. O objetivo deste trabalho foi bioprospectar novas cepas de bactérias magnetotáticas marinhas coletada em Cabo-Frio, litoral norte do Estado do Rio de Janeiro. BMs com comportamento tipo Sul foram observadas por microscopia óptica, sendo detectada inicialmente grande diversidade de morfotipos e após um ano a mesma amostra de sedimento apresentou um morfotipo de vibrio. O cultivo de amostra enriquecida magneticamente permitiu o isolamento de um bastonete magnetotático. A observação por microscopia eletrônica de transmissão mostrou que os bastonetes magnetotáticos apresentam duas cadeias de magnetossomos prismáticos diferenciados, pois seus cristais possuem um grau de estrangulamento no centro. Os magnetossomos se encontram dispostos em duas cadeias muito próximas, paralelas e sua quantidade varia de 4 a 7 cristais. A composição química dos magnetossomos do morfotipo bastonete foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X. Esses resultados forneceram informações necessárias para a caracterização de uma nova cepa de BM, o que contribui para a nossa compreensão acerca da biodiversidade destes microrganismos em território brasileiro.

Palavras-chave: bactérias magnetotáticas; magnetossomos; cultivo; biotecnologia.

Abstract

Mendes, Ligia Massa Bacellar. Bioprospecting of magnetotactic bacteria from the Cabo Frio Channel, RJ, Brazil. Rio de Janeiro, 2023. Dissertation (Master's Degree in Plant Biotechnology and Bioprocesses) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Magnetotactic bacteria (BMs) consist of a group of Gram-negative bacteria that display great diversity in terms of morphology, metabolism and evolutionary history. BMs are microaerophilic or anaerobic and are found in sediments of aquatic environments, stratified water columns and flooded soils. This group of bacteria has the ability to synthesize magnetic nanoparticles, called magnetosomes, through biomineralization, a process controlled at the genetic level by specific genes. Magnetosomes give them the ability to move aligned not only in the direction of the Earth's magnetic field, but also in the direction of induced magnetic fields. These properties of this group of bacteria provide them with unique characteristics that can be used and applicable in various biotechnological applications. BMs affiliated with the phyla Proteobacteria (within the classes Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- and Ca. Etaproteobacteria), Nitrospirae and Candidatus Omnitrophica have been described in recent years. The objective of this work was to bioprospect new strains of marine magnetotactic bacteria collected in Cabo-Frio, north coast of the State of Rio de Janeiro. BMs with Southern-like behavior were observed by optical microscopy, initially detecting a large diversity of morphotypes and after a year the same sediment sample presented a vibrio morphotype. The cultivation of a magnetically enriched sample allowed the isolation of a magnetotactic rod. Observation by transmission electron microscopy showed that magnetotactic rods have two chains of differentiated prismatic magnetosomes, as their crystals have a degree of strangulation in the center. Magnetosomes are arranged in two very close, parallel chains and their quantity varies from 4 to 7 crystals. The chemical composition of rod morphotype magnetosomes was determined by high-resolution transmission electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy. These results provided necessary information for the characterization of a new strain of BM, which contributes to our understanding of the biodiversity of these microorganisms in Brazilian territory. Keywords: magnetotactic bacteria; magnetosomes; cultivation; biotechnology.

Lista de figuras

Figura 1. Diversidade morfológica de BMs.....	2
Figura 2. Diversidade morfológica de magnetossomos	4
Figura 3. Organização dos MGCs em diferentes grupos filogenéticos de BMs.....	6
Figura 4. Representação esquemática da formação de BMs.....	7
Figura 5. Representação do magnetossomo com possíveis funcionalizações/aplicações descritas na literatura.....	14
Figura 6. Imagem de satélite do canal de Cabo Frio, Cabo Frio, RJ.....	19
Figura 7. Representação da concentração de BMs pela técnica de “racetrack”.....	21
Figura 8. Ilustração da técnica de gota pendente.....	21
Figura 9. Comparação dos morfotipos de BMs observados na amostra ambiental por DIC.....	27
Figura 10. Cultivo de BM em meio semissólido heterotrófico com gradiente de O ₂	28
Figura 11. Imagens de MET dos bastonetes magnetotáticos obtidos na cultura mista.....	29
Figura 12. Dimensões e fator de forma dos magnetossomos dos bastonetes magnetotáticos do canal de Cabo Frio.....	30
Figura 13. Mapa de elementos e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X.....	31
Figura 14. Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) de cadeia de magnetossomos do bastonete do canal de Cabo Frio/RJ.....	31
Figura 15. Análise taxonômica.....	33
Figura 16. Análise taxonômica.....	34
Figura 17. Árvore filogenética baseada em MamA	40
Figura 18. Árvore filogenética baseada em MamB	41
Figura 19. Árvore filogenética baseada em MamE	42
Figura 20. Árvore filogenética baseada em MamI	43
Figura 21. Árvore filogenética baseada em MamO	44
Figura 22. Árvore filogenética baseada em MamP	45

Figura 23. Árvore filogenética baseada em MamQ	46
Figura 24. Árvore filogenética baseada em MamM	47

Lista de tabelas

Tabela 1. Breve panorama das nanopartículas de magnetita. Suas origens, aplicações e referências.....	11
Tabela 2. Medidas de fatores abióticos.....	20
Tabela 3. Percentual de sequências montadas pelo programa MEGAHIT e metaSPAdes em cada grupo taxonômico.....	35
Tabela 4. Informações gerais sobre MAGs.....	35
Tabela 5. Informações sobre regiões codificantes dos MAGs.....	36
Tabela 6. Resultado do best hit bidirecional na busca por genes conservados de biomineralização.....	36

Lista de abreviaturas

BM: bactéria magnetotática

BMs: bactérias magnetotáticas

DIC: *differential interference contrast* (contraste interferencial diferencial)

EDS: *energy-dispersive X-ray spectroscopy* (espectroscopia de raios X por dispersão de energia)

HRTEM: *high resolution electronic transmission microscopy* (microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução)

MAGs: *metagenome-assembled genomes* (genomas montados por metagenoma)

MAI: *magnetosome island* (ilha do magnetossomo)

mam: *magnetosome membrane gene* (gene da membrana do magnetossomo)

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MGCs: *magnetosome gene cluster* (aglomerado de genes do magnetossomo)

OD: oxigênio dissolvido

ORF: open reading frame

PEG: polietilenoglicol

PVC: policloreto de polivinila

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Bactérias Magnetotáticas.....	1
1.2 Magnetossomos.....	3
1.3 Síntese dos magnetossomos.....	5
1.4 Cultivo de bactérias magnetotáticas e descrição de novas espécies.....	8
1.5 Taxonomia de bactérias magnetotáticas.....	15
2. Justificativa	16
3. Objetivos	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. Materiais e Métodos	18
4.1 Coleta de amostras.....	18
4.2 Prospecção de BMs nas frações de sedimento dos pontos de coleta 20	
4.3 Meios de cultura para BMs marinhas.....	21
4.4 Caracterização morfológica da cultura de BM do canal de Cabo Frio.....	21
4.4.1 Microscopia óptica.....	21
4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão convencional e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM).....	22
4.4.3 Análise de imagens.....	22
4.4.4 Espectroscopia de raios X.....	23
4.4.5 Metagenômica.....	23
4.4.5.1 Extração de DNA e sequenciamento	23
4.4.5.2 Sequenciamento de metagenoma.....	23
4.6.2 Montagem do metagenoma	24
4.6.3 Compartimentalização de genomas	24
4.6.4 Anotação e análise dos MAGs quanto aos genes de biomineralização	25
5. Resultados	26
5.1 Detecção de BMs nas amostras ambientais.....	26
5.2 Isolamento, cultivo e resposta magnética do bacilo magnetotático do canal de Cabo Frio.....	27
5.3 Caracterização morfológica da BM na cultura mista	28
5.4 Análise metagenômica da cultura mista	31
6. Discussão	48
6.1 Diversidade morfológica e cultivo de BMs	48
6.2 Bastonete magnetotático cultivado e suas implicações im biotecnologia	51
6.3 Metagenômica.....	55

7. Conclusões	56
8. Referências	57

1. Introdução

1.1 Bactérias magnetotáticas

As bactérias magnetotáticas (BMs) são um grupo de microrganismos aquáticos e flagelados, filogeneticamente diverso e metabolicamente versátil (BLAKEMORE, 1975). O termo “bactéria magnetotática” (BM) não possui significância taxonômica e representa um grupo heterogêneo de procariotos que exibem diferentes morfologias celulares (Figura 1), incluindo cocóide, bastonetes, vibrióide, espirilóide (helicoidal) e até multicelular (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004). Elas representam uma coleção de bactérias diversas, cosmopolitas em distribuição, mas, em uma base local, são microaerófilas ou anaeróbicas, encontradas em maior quantidade logo abaixo da interface óxico-anóxica em habitats aquáticos, onde podem constituir uma proporção significativa da população bacteriana (SIMMONS *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2009; SPRING *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 2012).

A descoberta dessas bactérias aconteceu em dois momentos independentes na história. Richard Blakemore observou que bactérias acumulavam na borda de uma gota de amostra ambiental quando observada ao microscópio óptico. Em um estudo publicado em 1975 caracterizou essas bactérias por microscopia eletrônica, o que permitiu a observação de estruturas eletrondensas na célula ricas em ferro e organizadas em cadeias dentro da célula, sugerindo seu papel no comportamento peculiar de resposta ao campo magnético (BLAKEMORE, 1975). Por volta dos anos 2000, foi descoberto que um pesquisador italiano publicou um trabalho interno na Universidade de Pavia sobre a existência de bactérias magnetossensíveis em amostras ambientais (FRANKEL, 2009). Bellini fez considerações relevantes pela utilização apenas da microscopia óptica (FRANKEL, 2009). De fato, o que foi muito importante nas duas descobertas foi observar que as células não eram atraídas ou repelidas pelo ímã utilizado no estágio do microscópio óptico para observação da inversão do nado das bactérias na amostra ambiental quando a polaridade do ímã era invertida. A observação de que as células mortas giravam quando o campo magnético era invertido e não se deslocavam preferencialmente para uma polaridade magnética do ímã permitiu a descrição da magnetotaxia e posteriormente a classificação de BMs em tipo sul e tipo norte, sendo estas as que nadam preferencialmente para os pólos Sul e Norte geográficos, respectivamente (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004).

Estudos fisiológicos de diversas cepas de BMs mostram que elas têm potencial para

participar do ciclo biogeoquímico de vários elementos importantes incluindo ferro, nitrogênio, enxofre e carbono (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004). Essas bactérias são consideradas por muitos como mesófilas, restritas a habitats com valores de pH próximos à neutralidade. No entanto, algumas espécies extremófilas foram descritas (LOWER & BAZYLINSKI, 2013) como o microrganismo magnetotático multicelular de ambiente hipersalino, *Candidatus Magnetoglobus multicelulares* (ABREU *et al.*, 2007) e uma BM moderadamente termofílica com temperatura de crescimento máxima de 63°C (LEFÈVRE *et al.*, 2010). Também há relatos de cocos magnetotáticos que toleram temperaturas inferiores a 4°C encontradas na Antártica (ABREU, 2010).

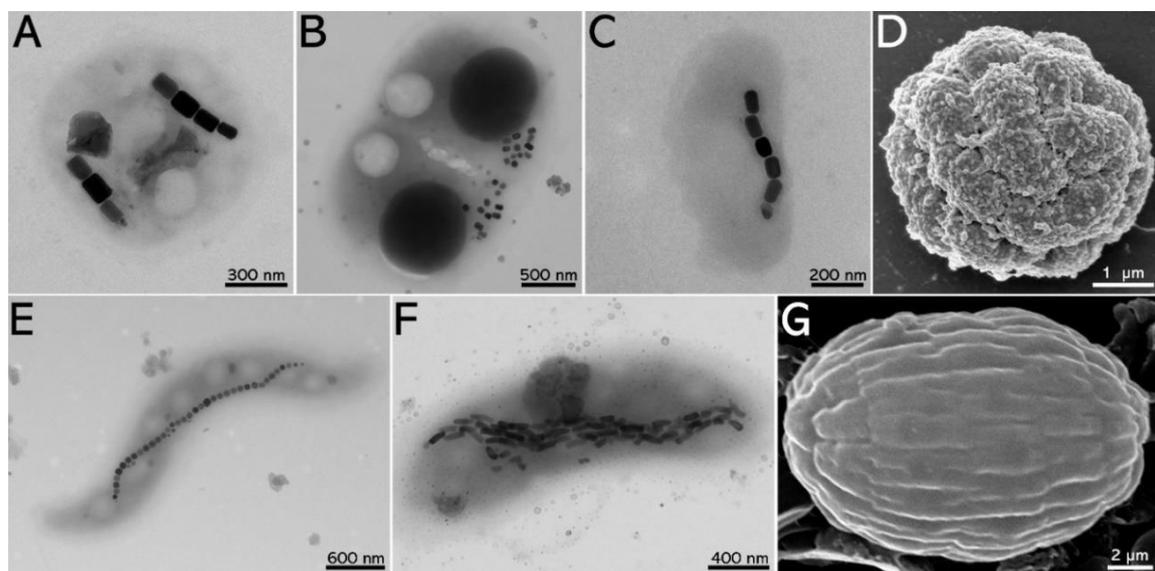


Figura 1. Diversidade morfológica de BMs. **A.** Cocco não cultivado com 2 cadeias de magnetossomos prismático alongados (Paraty Mirim – RJ). **B.** Ovóide não cultivado de Gold Strike apresentando magnetossomos prismáticos desorganizados (Nevada – EUA). **C.** Vibrião não cultivado com magnetossomos prismáticos alinhados em cadeia (Paraty Mirim – RJ). **D.** MMP esférico não cultivado encontrado em lagoa hipersalina (Araruama – RJ). Retirado de Abreu *et al.*, 2008. **E.** Espirilo não cultivado com uma única cadeia de magnetossomos cuboctaédricos alinhados (Maricá – RJ). **F.** Bacilo não cultivado com magnetossomos anisotrópicos alinhados (Campos dos Goytacazes – RJ). **G.** MMP elipsoide não cultivado encontrado na China (Rongcheng City, China) (Leão *et al.*, 2017). Todas as imagens, exceto 2D e 2F, foram obtidas do acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia do IMPPG, UFRJ. **A.**, **B.**, **C.**, **E.** e **F.** correspondem a BMs unicelulares observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). **D.** e **G.** correspondem a MMPs observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Figura retirada de Taveira (2021).

Espécies de BMs são encontradas em diversos grupos filogenéticos, incluindo as classes Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Eta- do filo Proteobacteria, no filo Nitrospirae, Latescibacteria (também conhecida como divisão candidata WS3); Omnitrophica e superfilo PVC (ABREU *et al.* 2018; KOLINKO *et al.*, 2012; UEBE & SCHÜLER, 2016; LIN *et al.*, 2018).

1.2 Magnetossomos

BMs são conhecidas pela sua capacidade de produzir nanopartículas magnéticas, chamadas magnetossomos. Estas estruturas são envoltas por uma membrana composta por uma bicamada lipídica que contém fosfolípidos, glicoproteínas e proteínas específicas do magnetossomo, algumas das quais são responsáveis pelo processo de biomineralização (FAIVRE & SCHÜLER, 2008, MADIGAN *et al.*, 2010). A porção cristalina do magnetossomo podem ser constituídas de magnetita (Fe_3O_4) (FRANKEL *et al.*, 1979) ou de greigita (Fe_3SO_4) (MANN *et al.*, 1990), dependendo da espécie de BM. Geralmente estas estruturas estão organizadas em cadeia única ou múltipla no citoplasma celular, o que também é regulado por genes presentes no cluster de genes do magnetossomo (MGC; *do inglês magnetosome gene cluster*) (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004). A organização dos magnetossomos em cadeia confere a célula um momento magnético, o que permite seu alinhamento passivo em relação ao campo geomagnético ou à campos magnéticos palicados (ímãs) (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004).

Os magnetossomos apresentam uma faixa estreita em tamanho variando de 35 a 120 nm podendo variar entre espécies (BAZYLINSKI & SCHÜBBE, 2007). Assim como o comprimento, a morfologia dos cristais de magnetossomos e sua organização dentro da célula tende a ser única em uma espécie particular desse grupo de bactérias (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004). Existem três principais morfologias de cristais de magnetita: cuboctaédrica, prismática alongada e anisotrópica em forma de “ponta de lança” (LOWER & BAZYLINSKI, 2013) (Figura 2). O controle preciso do processo de formação dos magnetossomos permite que essas estruturas tenham características superiores às encontradas em partículas de ferro artificialmente sintetizadas (XIE *et al.*, 2009), como distribuição estreita de tamanho, morfologia uniforme e domínio magnético único dos cristais, além do envoltório membranosos mencionado anteriormente.

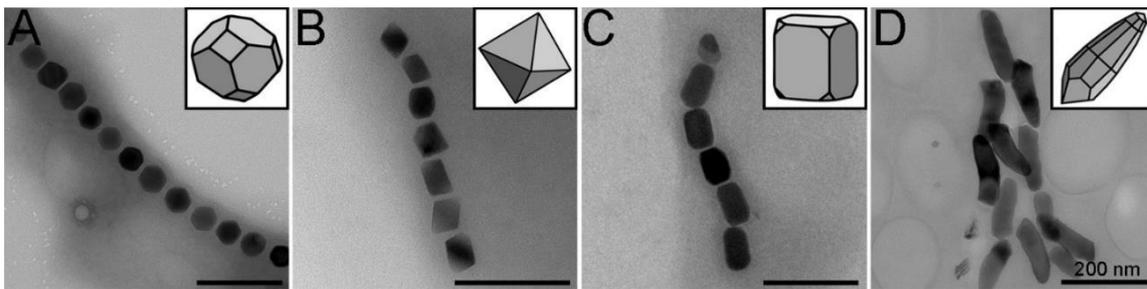


Figura 2. Diversidade morfológica de magnetossomos. **A.** Magnetossomos cubo-octaédricos alinhados em cadeia em espirilo não cultivado de amostras coletadas no rio Ubatiba (Maricá – RJ). Ilustração inserida: morfologia cristalina cubo-octaédrica. **B.** Magnetossomos octaédricos alinhados em cadeia em vibrião não cultivado encontrado em amostras coletadas no Saco do Mamanguá (Paraty Mirim – RJ). Ilustração inserida: morfologia cristalina octaédrica. **C.** Magnetossomos com morfologia prismática alongada ou pseudo-hexagonal organizados em cadeia em um vibrião não cultivado encontrado em amostras coletadas no Saco do Mamanguá (Paraty Mirim – RJ). Ilustração inserida: morfologia cristalina prismática. **D.** Seção de um bastonete não cultivado encontrado em amostras provenientes do rio Ururaí (Campos dos Goytacazes – RJ) contendo magnetossomos com morfologia anisotrópica. Ilustração inserida: morfologia cristalina anisotrópica. Todas as imagens foram obtidas do acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia do IMPPG, UFRJ. Figura de Taveira (2021).

A presença de magnetossomos nas BMs e o consequente alinhamento ao campo geomagnético, somado à rotação flagelar lhes permite migrar de forma orientada e ativamente em ambientes quimicamente estratificados, resultando em um fenômeno chamado magnetotaxia (SCHÜLER, 2007). Acredita-se que os magnetossomos e a magnetotaxia funcionem como um meio para modular a quimiotaxia mais eficientemente, permitindo à célula localizar-se e manter-se numa posição ótima para crescer e sobreviver na interface óxico-anóxica (BAZYLINSKI & LEFÈVRE, 2013).

Embora o papel ecológico dos magnetossomos ainda não esteja totalmente definido, é possível que a capacidade de se orientar em um campo magnético corresponda a uma vantagem seletiva na manutenção desses organismos microaerofílicos em zonas de baixa concentração de oxigênio, próximo à interface óxica/anóxica (MADIGAN *et al.*, 2010). Diversos fatores influenciam a biomineralização dos magnetossomos, concentração de oxigênio e a presença de óxidos de nitrogênio possuem alta relevância neste processo (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004).

Os magnetossomos possuem diferentes aplicações biotecnológicas, devido às suas propriedades estruturais e magnéticas únicas e sua membrana biocompatível (LOWER & BAZYLINSKI, 2013). Alguns exemplos são a ancoragem e *delivery* de fármacos, imobilização de enzimas e biorremediação, uma vez que devido às proteínas que estão presentes na membrana do magnetossomo, é possível a adição de moléculas na superfície do mesmo (XU *et al.*, 2014). Outros exemplos de aplicações já descritas envolvem o uso de

magnetossomos na separação de células, contraste de imagem e análise de DNA/antígeno. Magnetossomos permitiram a realização de estudos sobre análise de contaminação em alimentos por microrganismos patogênicos, hipertermia magnética e separação de células (MANUCCI *et al.*, 2018; VARGAS *et al.*, 2018; YOSHINO *et al.*, 2008). As aplicações biotecnológicas dos magnetossomos serão descritas em maior detalhe em item específico da introdução.

Correa *et al.*, (2021) sugeriram que os magnetossomos podem representar o desenvolvimento da Nanotecnologia sustentável. Características dessas nanopartículas consideradas vantajosas quando comparadas com nanopartículas artificiais são sua alta perfeição cristalográfica e pureza química (BAZYLINSKI & FRANKEL, 2004; FISCHER *et al.*, 2011), alta resistência a temperaturas (CYPRIANO *et al.*, 2020), a presença de uma membrana biológica natural e biocompatível, a possibilidade de produção por BMs cultivadas em biorreator, o que é uma alternativa ecologicamente amigável, uma vez que não gera resíduos tóxicos.

1.3 Síntese dos magnetossomos

A síntese dos magnetossomos é um processo altamente controlado por uma complexa maquinaria proteica, codificada por uma região específica do genoma bacteriano denominada inicialmente ilha do magnetossomo (MAI, do inglês *magnetosome gene island*; BARBER-ZUCKER & ZARIVACH, 2016; UEBE & SCHÜLER, 2016). Em espécies de *Magnetospirillum*, a MAI contém um conjunto de aproximadamente 30 genes *mam* (denominação proveniente da expressão em inglês *magnetosome membrane*) e *mms* (denominação proveniente da expressão em inglês *magnetic-particle-membrane specific*) (UEBE & SCHÜLER, 2016) (Figura 3). Genes de biomineralização são exclusivos de BMs, estando presentes em todas as espécies; há variação em conteúdo e sintonia dos genes, mas em geral são conservados (Figura 3). Além dos genes *mam* e *mms*, outros grupos de genes de biomineralização de magnetossomos também foram descritos, porém estão restritos a alguns grupos específicos de BMs. Como exemplo temos: (i) os genes *mad* (do inglês *magnetosome associated Deltaproteobacteria*) (Figura 3), descritos inicialmente em deltaproteobactérias (LEFÈVRE *et al.*, 2013) e posteriormente descobertos em BMs pertencentes aos filos Nitrospirae e Omnitrophica (Figura 3); e (ii) os genes *man*, descritos inicialmente em BM pertencentes ao filo Nitrospirae (do inglês *magnetosome genes in Nitrospirae*) (Figura) (LIN *et al.*, 2014).

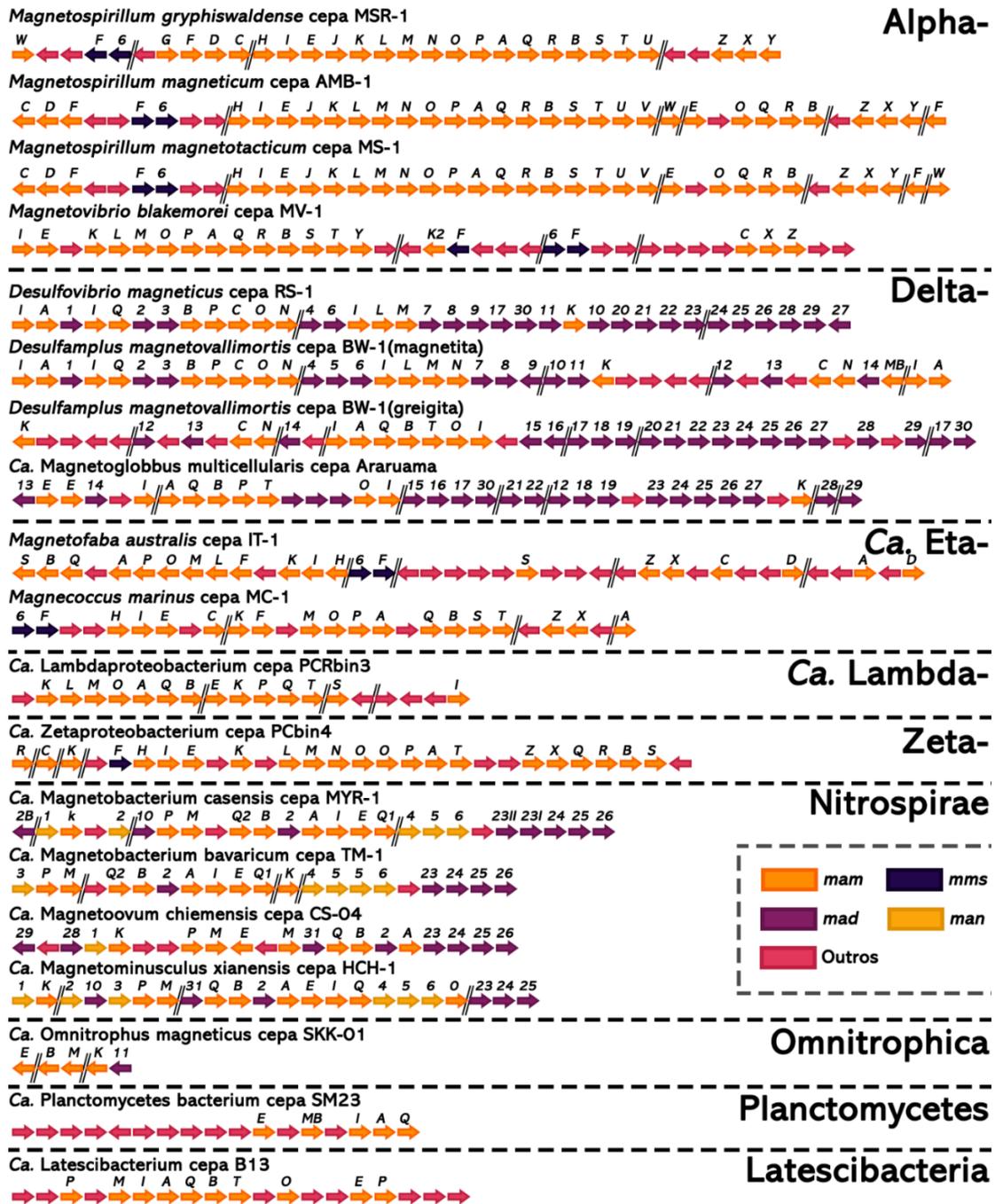


Figura 3. Organização dos MGCs em diferentes grupos filogenéticos de BMs. O conjunto de genes relacionados à biomineralização do magnetossomo foi reportado em BMs e sequências obtidas por metagenoma em diferentes grupos filogenéticos, dentre eles: (i) em BMs afiliadas ao filo Proteobacteria referente às classes Alpha-, Delta- e Ca. Etaproteobacteria; (ii) sequências obtidas a partir de metagenoma afiliadas as classes Ca. Lambda- e Zetaproteobacteria referentes ao filo Proteobacteria; (iii) BMs não cultivadas afiliadas aos filios Nitrospirae e Omnitrophica; e (iv) sequências obtidas a partir de metagenoma afiliadas aos filios Ca. Latescibacteria e Planctomycetes. Genes *mam* (laranja) são encontrados em representantes magnetotáticos de todos os grupos filogenéticos de BMs ao passo que outros genes são restritos à grupos específicos. Genes *mms* (azul marinho) estão restritos à proteobactérias magnetotáticas. Genes *mad* (roxo) foram primeiramente descobertos em genomas de deltaproteobactérias magnetotáticas e posteriormente foram reportados genes homólogos a estes em BMs afiliadas aos filios Nitrospirae e Omnitrophica. Genes *man* (amarelo) estão presentes somente em BMs afiliadas ao filo Nitrospirae. Outros genes (rosa) não relacionados ao processo da biomineralização também estão representados na organização dos MGCs. Cypriano *et al.* (2019).

Informações sobre o mecanismo de síntese dos magnetossomos em BMs são baseadas em estudos realizados com espécies de *Magnetospirillum*, pois é um gênero que inclui bactérias de mais fácil cultivo, sendo possível a obtenção de colônias em placas, o que facilita a seleção de mutantes, e para as quais existe sistema genético disponível para deleção e expressão de genes (UEBE & SCHÜLER, 2016). As proteínas relacionadas à produção dos magnetossomos pertencem a famílias com características variadas que incluem: proteínas TPR (*tetratricopeptide repeat*: MamA), transportadores CDF (do inglês *cation diffusion facilitators*: MamB e MamM), serina proteases HtrA-like (MamE, MamP e MamO), proteínas actina-like (MamK), transportadores genéricos (MamH e MamN) e proteínas específicas de BMs sem homologia com outras proteínas em organismos não magnéticos (MamG, MamF, MamD, MamC, MamJ, MamW, MamX, MamY, Mms6, MtxA) (UEBE & SCHÜLER, 2016). De forma geral, as proteínas Mam estão envolvidas em quatro funções principais na formação do magnetossomo: (i) formação da membrana do magnetossomo (MamI, MamL e MamAB); (ii) formação do cristal (MamE, Mms6, MamB e MamM); (iii) maturação do cristal (MamE, MmsF, MamGFDC e Mam P, S, T); e (iv) alinhamento do magnetossomo em cadeia (MamJ e MamK) (Figura 4; MURAT *et al.*, 2010).

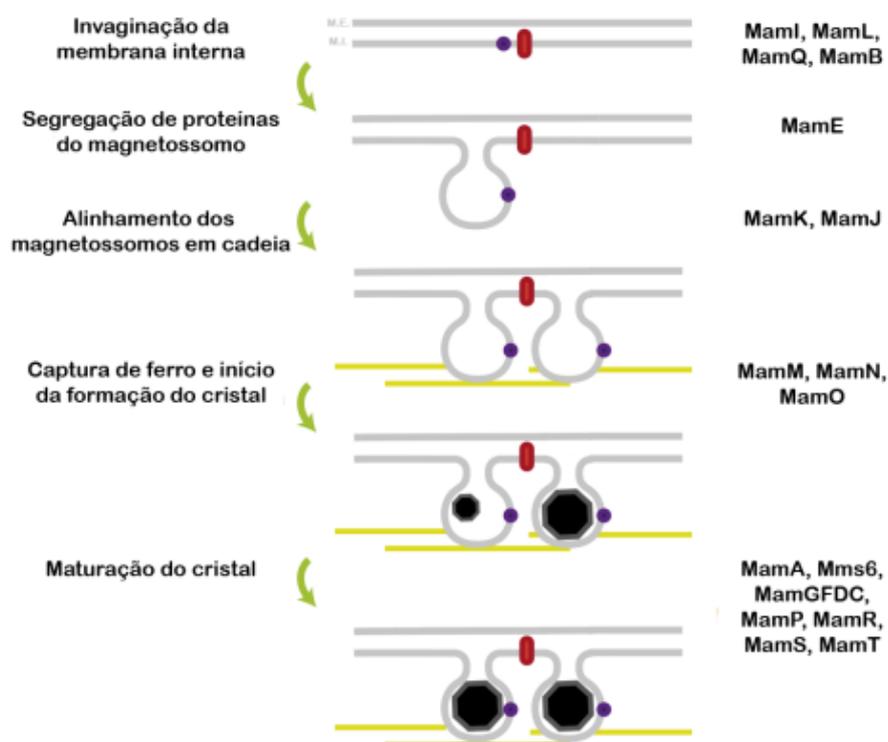


Figura 4. Representação esquemática das etapas de formação das BMs. As proteínas codificadas pelos genes de biomineralização que controlam o processo estão indicadas nas etapas de sua atuação. Adaptado de MURAT *et al.* (2010).

A biomineralização do magnetossomo obedece, obrigatoriamente, seis etapas: (i) o sequestro de ferro através de bombeamentos ativos para o citoplasma da célula; (ii) a invaginação da membrana citoplasmática a fim de formar a membrana do magnetossomo; (iii) a nucleação do mineral; (iv) o recrutamento de proteínas específicas para a membrana do magnetossomo; (v) controle do tamanho e balanço redox do nanocristal; e (iv) alinhamento e fixação da organela no citoesqueleto celular (WERCKMANN *et al.*, 2017).

Estudos realizados nas espécies *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (TAOKA *et al.*, 2017) e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 (MURAT *et al.*, 2010) forneceram grande parte das informações que se tem sobre o processo de biomineralização. Nesses estudos foram realizadas deleções de genes *mam* e *mms*, permitindo que, a partir de alterações fenotípicas nesses mutantes, a função do gene fosse inferida. O avanço e aprimoramento das técnicas moleculares permitiu que muitas BMs tivessem seus genomas sequenciados tornando possíveis novas análises e comparações entre esse grupo de procariotos. Algumas BMs cultivadas em laboratório puderam ter seus genomas completos sequenciados enquanto outras BMs ambientais estudadas a partir de técnicas independentes de cultivo constam com informações parciais sobre o genoma destes procariotos. Análises comparativas dos genomas totais ou parciais das BMs pertencentes à classe Alphaproteobacteria revelaram uma região bem conservada e móvel que, em analogia às ilhas de patogenicidade, e por isso recebeu o nome de MAI, que contém genes essenciais para a formação de magnetossomos (RICHTER *et al.*, 2007).

Em 2017 foi proposta uma nova terminologia de MGCs - agrupamentos de genes do magnetossomo (LIN *et al.*, 2017), visto que a maior parte das BMs analisadas não apresenta esta região móvel (LIN *et al.*, 2017). A análise comparativa dos genomas de BMs afiliadas aos filos Proteobacteria, Nitrospirae e Omnitrophica mostrou que esses genes são conservados (LIN *et al.*, 2018). Novas evidências recentes revelaram que BMs não cultivadas anteriormente desconhecidas são afiliadas ao filo candidato Omnitrophica, ao filo candidato Latescibacteria (anteriormente conhecido como divisão candidata WS3) e ao superfilo PVC, sugerindo assim que a magnetotaxia é provavelmente mais difundida no domínio Bacteria do que se pensava anteriormente (KOLINKO *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2018).

1.4 Cultivos de bactérias magnetotáticas e descrição de novas espécies

Apesar da diversidade filogenética e morfológica, da presença comum das BMs e da

sua elevada abundância em sedimentos de habitats de águas doces e marinhos, o isolamento e cultivo destas bactérias é difícil (POSTEC *et al.*, 2012). A maioria das BMs que existem hoje em cultura foram isoladas a partir de amostras de água doce ou de sedimentos de águas salobras à temperaturas entre 24 e 28°C, apesar da sua distribuição ecológica incluir ambientes polares, termais, salinos, hipersalinos, e extremamente alcalinos (BAZYLINSKI *et al.*, 2013). Há evidências de que a riqueza e diversidade das BMs nos diferentes ambientes é fortemente influenciada pela salinidade, apesar de a temperatura, disponibilidade de ferro e concentração de compostos de enxofre também ser importante na distribuição destas bactérias (LIN & PAN, 2010; POSTEC *et al.*, 2012).

A maioria das BMs depende de gradiente químico estratificado para sobrevivência e cresce razoavelmente bem em meios de culturas com um gradiente de concentração de oxigênio e a baixa concentração de nutrientes. Tal estratégia de cultivo, especialmente concebidas para organismos quimiolitotróficos e microaerófilos, tem sido aplicada com relativo sucesso para isolar novas cepas de BMs, uma vez que os organismos heterotróficos de crescimento rápido competem e vencem as BMs em meios de cultura mais ricos e que contenham fontes orgânicas de carbono (BAZYLINSKI *et al.*, 2013). O isolamento das cepas de BMs em cultura pura pode ser feito através de ciclos seguidos de séries de diluições; por enriquecimento magnético e utilizando a técnica de “shake tube” (BAZYLINSKI *et al.*, 2013 SEELEY *et al.*, 1991).

Uma vez que uma cepa específica de BMs é isolada, o crescimento pode por vezes ser aumentado através da utilização de meios heterotróficos mais ricos com diferentes substratos orgânicos e inorgânicos e diversos aceptores de elétrons. As taxas de crescimento, bem como de produção de magnetossomos, variam bastante mesmo dentro da mesma cepa, dependendo se a ela é cultivada autotrófica ou heterotroficamente, aeróbia ou anaerobicamente, e se são usadas diferentes fontes de carbono e ferro. Desta forma, condições de cultura específicas são requeridas para o crescimento em massa destas bactérias e aumento da produção dos seus magnetossomos para possibilitar sua utilização em biotecnologia (ARAUJO *et al.*, 2015; LI & PAN, 2012; MOISESCU *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2012).

Apesar da grande dificuldade de cultivar em laboratório, BMs têm sido isoladas em culturas axênicas na última década (LEFÈVRE & WU, 2013). Filogeneticamente, a maioria está relacionada às alfa-proteobactérias, das quais a ordem *Rhodospirillales* contém bactérias de água doce do gênero *Magnetospirillum*: *Ms. Magneticum* cepa AMB- 1, *Ms.*

Magnetotacticum cepa MS-1, *Ms. Gryphiswaldense* cepa MRS-1. Outra BM afiliada a Alphaproteobacteria de destaque é *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1^T. Esta BM foi isolada de sedimentos ricos em sulfetos em um pântano salgado perto de Boston, Massachussets, EUA (BAZYLINSKI *et al.*, 2013). As células da cepa MV-1^T são Gram-negativas e possuem morfologia vibrióide helicoidal. As células são móveis por meio de um único flagelo polar e nadam em ambas as direções, apresentando excursões mais longas em uma direção do que na outra. As células possuem uma única cadeia de magnetossomos contendo cristais prismáticos de magnetita, posicionados ao longo do eixo longo da célula. A ordem *Magnetococcales*, inicialmente classificada em Alphaproteobacteria e atualmente em *Etaproteobacteria*, é composta por todos os cocos magnetotáticos dos quais *Magnetococcus marinus* cepa MC-1, *Magnetofaba australis* cepa IT-1 e *Candidatus Magnetococcus massalia* cepa MO-1 são cultivadas (BAZYLINSKI *et al.*, 2013; LEFÈVRE *et al.*, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2010).

A maioria das BMs cultivadas e não cultivadas foram filiadas à Alphaproteobacteria e Etaproteobacteria. Além destas, outro grupo importante é formado por deltaproteobactérias magnetotáticas, que contém a BM cultivada redutora de sulfato *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1 (KAWAGUICHI *et al.*, 1995) e bastonetes produtores de magnetita e greigita isolados de água doce denominados cepa BW-1 (LEFÈVRE *et al.*, 2011)

Embora um esforço maior seja necessário para que progressos relativos à descrição de novas espécies de BMs isoladas em culturas aumente no mundo, diversos estudos já foram conduzidos nesse sentido. Um estudo brasileiro (ABREU *et al.*, 2007) conduziu a caracterização de um procarioto magnetotático multicelular *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* que habita uma grande lagoa hipersalina costeira do Brasil. Esse microrganismo consiste em um conjunto compacto ou agregado de células bacterianas flageladas, altamente organizadas em uma esfera, que nadam em trajetórias retas ou helicoidais ou reta. O mesmo grupo de pesquisa liderado pelo Professor Ulysses Lins realizou o cultivo desse microrganismo em cultura de enriquecimento (ABREU *et al.*, 2014).

A primeira cultura axênica de uma BM isolada no Hemisfério Sul (Lagoa de Itaipu no Rio de Janeiro, Brasil) foi descrita por MORILLO *et al.* (2014). As células possuem morfologia cocoides a ovoides e cresceram microaerofilicamente em meio semi-sólido contendo uma concentração de oxigênio gradiente em condições quimioorganoheterotróficas ou quimiolitototróficas. Cada célula contém uma única cadeia

de aproximadamente 10 magnetossomos de (Fe₃O₄) magnetita com formato octaédrico alongado. Análise filogenética baseada na sequência do gene que codifica o rRNA 16S mostrou que a BM cocoide isolada neste estudo representou um novo gênero em Alphaproteobacteria; o nome proposto para a cepa de IT-1 foi *Magnetofaba australis*.

1.4. Aplicações biotecnológicas de nanopartículas de magnetita

Nanopartículas de magnetita possuem diversas aplicações biotecnológicas nos campos da nanobiotecnologia, nanomedicina e geomicrobiologia, podendo ter origem sintética (CORNELL & SCHWERTMANN, 2003; WALLYN *et al.*, 2019) ou biogênica (FRANKEL *et al.*, 2007; VARGAS *et al.*, 2018) (Tabela 1).

Tabela 1. Breve panorama das nanopartículas de magnetita. Suas origens, aplicações e referências.

<i>Tipo</i>	<i>Origem</i>	<i>Aplicação</i>	<i>Referência</i>
Magnetita super-paramagnética	Sintética	Agente de contraste em ressonância magnética	BABES <i>et al.</i> , 1999
Dynabeads®	Sintética	Isolamento de células, organelas, mRNA, DNA genômico e proteínas	BOSNES <i>et al.</i> , 1997
Nanopartícula de magnetita	Sintética	Análise de contaminantes na comida	CAO <i>et al.</i> , 2012

Magnetossomo	Biogênica (cepa MSR-1)	Carreamento de fármaco antitumoral	SUN <i>et al.</i> , 2008
Magnetossomo	Biogênica (cepa AMB-1)	Tratamento de tumor por hipertermia	ALPHANDÉRY <i>et al.</i> , 2011
Magnetossomo	Biogênica (cepa AMB-1)	Separação de células sanguíneas	YOSHINO <i>et al.</i> , 2008

Diversos sistemas de nanopartículas magnéticas foram desenvolvidos nas últimas décadas (REDDY *et al.*, 2012) e compreendem em sua maioria a síntese de nanopartículas por precipitação de minerais de ferro, como a magnetita (NIEMIROWICZ *et al.*, 2016; SALDANHA *et al.*, 2016). No entanto, a maioria dos processos de síntese química não produz nanopartículas de tamanhos e formas uniformes, o que torna difícil a previsão de suas propriedades magnéticas e quando o fazem são processos químicos finos extremamente caros (LLOYD *et al.*, 2011).

Magnetossomos superam essas limitações, uma vez que são produto de um processo biológico com controle genético refinado. Possuem grande potencial para aplicação como nanopartículas bifuncionais devido às suas propriedades de tamanho forma e dispersão (YAN *et al.*, 2012). Magnetossomos apresentam características muito atrativas que se sobrepõem às evidenciadas pelas nanopartículas de óxido de ferro quimicamente sintetizadas. Em primeiro lugar, enquanto os magnetossomos são cobertos por uma membrana biológica, que garante uma superfície para funcionalização e compatibilidade biológica (VARGAS *et al.*, 2018). Comparativamente, as nanopartículas quimicamente sintetizadas não são revestidas por compostos naturais, necessitando ser estabilizadas, por exemplo, através de um revestimento com moléculas de dextrano ou polietilenoglicol (PEG), o que faz com que a sua síntese seja complexa e custosa (ALPHANDÉRY, 2014).

Em segundo lugar, os magnetossomos apresentam um momento magnético

termicamente estável, apresentando melhores propriedades magnéticas quando comparadas àquelas encontradas em nanopartículas de óxido de ferro quimicamente sintetizadas, que normalmente são superparamagnéticas, e possuem um momento magnético termicamente instável.

Em um contexto de separação celular, quando comparados os magnetossomos com esférulas magnéticas e nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas concluiu-se que estes últimos dois tipos de partículas magnéticas revelam ter alguns inconvenientes. As esférulas magnéticas são grandes e, conseqüentemente, evitam que as células se dividam e proliferem corretamente, enquanto as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas apresentam um fraco magnetismo devido ao seu momento magnético instável à temperatura fisiológica e ambiente, o que faz com que tenham um desempenho baixo na separação de células. Em contrapartida, os magnetossomos são menores que as esférulas magnéticas e apresentam maior força magnética que as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas.

Os magnetossomos também apresentam maior coercividade (propriedade que alguns metais têm de conservarem as características magnéticas que lhes tenham sido induzidas), de razão entre magnetização remanescente (magnetismo que uma substância ferromagnética conserva após a intensidade do campo que a magnetizou ter sido anulado) e magnetização de saturação (estado alcançado quando o aumento da aplicação de um campo magnético externo não aumenta a magnetização do material sob o qual é aplicado o campo). Em condições específicas, estas propriedades magnéticas podem resultar, por exemplo, em maior capacidade de aquecimento e melhor contraste dos magnetossomos em ressonância magnética comparativamente às nanopartículas quimicamente sintetizadas (ALPHANDÉRY, 2008; ALPHANDÉRY, 2014; PAN *et al.*, 2005).

Por fim, magnetossomos produzidos por processos biológicos apresentam características dimensionais únicas que são difíceis de obter através da síntese química de nanocristais magnéticos. Estas características incluem uma gama de tamanho uniforme e elevado grau de perfeição cristalográfica, o que se traduz numa elevada estabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, por não ser facilmente degradado em sistemas biológicos, o que poderia ocasionar liberação intensa de ferro (ARAKAKI *et al.*, 2008; BAZYLINSKI *et al.*, 1994).

Além destas características que são de extrema importância para a aplicação biotecnológica destas nanopartículas magnéticas, a produção de magnetossomos é considerada um processo totalmente sustentável e relativo baixo custo, considerando o revestimento natural do nanocristal de magnetita pela membrana do magnetossomo (CORREA *et al.*, 2021). Isto contrasta com a utilização de produtos tóxicos frequentemente utilizados na preparação das nanopartículas quimicamente sintetizadas (ALPHANDÉRY, 2014; BAZYLINSKI & FRANKEL, 1994; FAIVRE & SCHÜLER, 2008).

Magnetossomos possuem diversas aplicações biotecnológicas relevantes (Figura 5). Essas nanopartículas de origem biológica são de grande interesse na medicina, pois podem ser empregadas como carreadoras de fármacos e suas proteínas de superfície podem servir como âncoras para a expressão de enzimas ou anticorpos. Magnetossomos podem ser utilizados em tratamentos com hipertermia que consiste num superaquecimento das nanopartículas dentro de um tumor, por exemplo, visando a destruição do mesmo de dentro para fora. Também são empregados em separação celular, biorremediação e técnicas de extração de DNA (HONDA *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2017; VARGAS *et al.*, 2018).

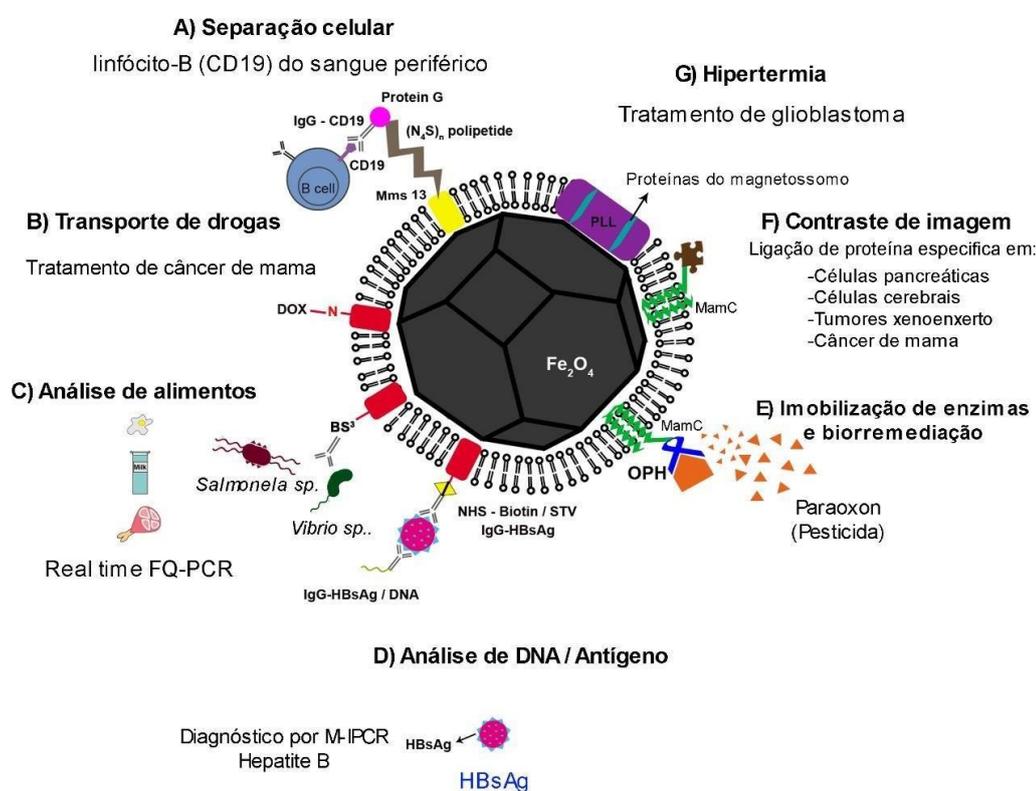


Figura 5. Representação do magnetossomo com possíveis funcionalizações/aplicações descritas na literatura (separação celular, hipertermia, transporte de fármaco, geração de contraste de imagem, análise de alimentos, imobilização enzimática e biorremediação, recuperação/detecção de antígeno/DNA). Figura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

Considerando a relevância de espécies de BMs em Biotecnologia, novamente as pertencentes ao gênero *Magnetospirillum* ganham destaque, principalmente por seu crescimento ter sido otimizado em larga escala para atingir alta produção com baixo custo (US\$ 16,86 por grama de magnetita; ZHANG *et al.*, 2011). No entanto, outras características além do custo de produção podem fazer com que o custo da tecnologia baseada em magnetossomos a ser desenvolvida seja melhorada, visando a diminuição do custo pelo aumento da eficiência do processo. SILVEIRA (2022) mostrou que a eficiência de funcionalização de magnetossomos prismáticos produzidos pela BM *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T é consideravelmente maior, o que representa carreamento de maior quantidade das moléculas de interesse. A diferença dos magnetossomos de BMs desses gêneros está na forma dos magnetossomos e tamanho; em *Magnetospirillum* os magnetossomos são cubooctaédros de 35-40 nm e em *Magnetovibrio* são prismáticos de 60 nm.

1.5 Taxonomia de bactérias magnetotáticas

Estudos da diversidade de BMs se beneficiam da vantagem de que essas bactérias podem ser facilmente separadas de partículas de sedimentos e de outras bactérias com base em sua magnetotaxia. Esta é a razão pela qual o conhecimento atual sobre diversidade de MTB depende em menor medida do isolamento e caracterização de culturas puras, a ferramenta clássica da Microbiologia do que em outros grupos de microorganismos (FLIES *et al.*, 2005).

Microscopias de enriquecimentos magnetotáticos recuperados de várias amostras ambientais, isso é uma separação e concentração das BMs da amostra ambiental usando um ímã, revelaram consistentemente significativa diversidade morfológica e ultraestrutural de BMs. No entanto, dos muitos morfotipos detectados, incluindo spirilos, cocos, vibriões, ovóides, em forma de bacilo e mesmo bactérias multicelulares, apenas algumas bactérias poderiam até agora ser isoladas em cultura pura. A taxonomia de BMs é, portanto, fortemente baseada em técnicas independentes de cultivo aplicadas à BMs concentradas de amostras ambientais pela utilização de ímãs e técnicas de purificação como racetrack (WOLFE *et al.*, 1987; LINS *et al.*, 2003), que consistem em lavar a amostra utilizando água do local estéril e concentração magnética. Dessa forma, a taxonomia de BM inclui o emprego da análise comparativa de sequências de genes que codificam o rRNA 16S que podem ser

investigados sem cultivo prévio e análise morfológica e ultraestrutural por técnicas de microscopia. Com o avanço de técnicas de sequenciamento, está sendo possível o estudo genômico de BMs não cultivadas com extrema facilidade.

A descrição de espécies de bactérias não cultivadas, porém bem caracterizadas é válida e deve ser feita nomeando a nova espécie no status de *Candidatus* (MURRAY & STACKEBRANDT, 1995). Um exemplo bem sucedido de aplicação das técnicas independentes de cultivo supracitadas é a caracterização de *Candidatus Magnetobacterium bavaricum*, que é um bastonete magnetotático afiliado a Nitrospirae produtor de magnetossomos anisotrópicos em grande quantidade, isso é, quantidade superior ao que seria necessário para o alinhamento da célula no campo geomagnético (JOGLER *et al.*, 2010).

2. Justificativa

Microrganismos compreendem o maior número de organismos individuais do planeta Terra (LOCEY & LENNON, 2016). Na melhor das hipóteses, através de estudos baseados em técnicas dependentes de cultivo, a ciência identificou e está ciente de apenas uma fração minúscula deles. Em algum lugar entre 1% e 0,1% de todas as espécies bacterianas existentes foram descritas (COLWELL & HAWKSWORTH, 1991) e a grande maioria das restantes 4×10^7 a 3×10^6 espécies bacterianas (Systematics Agenda, 2000) é desconhecida (BARNES *et al.*, 1994; COLWELL *et al.*, 1994; WOESE, 1994). No entanto, houve diversos avanços de diferentes áreas da ciência devido ao desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de DNA em larga escala, possibilitando e facilitando a descrição de novas espécies de microrganismos.

Apesar dos avanços tecnológicos no campo da microscopia e também em pesquisas relacionadas à descrição de novas espécies de microrganismos a diversidade de BMs ainda é um assunto pouco explorado (BAZYLINSKI *et al.*, 2014; UEBE & SCHÜLER, 2016; ALI *et al.*, 2017). Neste estudo de BMs e seus magnetossomos visamos enriquecer o entendimento acerca da biodiversidade destes microrganismos em território brasileiro. Além disso, o potencial biotecnológico das BMs é enorme. No entanto, poucas espécies são isoladas ou tem metabolismo vantajoso para larga escala e isolamento de magnetossomos (crescimento celular rápido com alta produção de magnetossomos). Caracterizar BMs capazes de sintetizar grandes quantidades de magnetossomos é um esforço necessário, pois a maior dificuldade na aplicabilidade dos magnetossomos é a demanda por grandes quantidades da nanopartícula através do cultivo em massa das BMs. O cultivo de novas espécies de BMs se justifica também pelo potencial de aplicabilidade de magnetossomos com diferentes formas. Recentemente, nosso grupo demonstrou que magnetossomos produzidos por espécies diferentes de BMs possuem diferentes eficiências de captura de moléculas (SILVEIRA, 2022), o que indica que magnetossomos com formas e tamanhos diferentes tenham respostas diferentes dependendo da abordagem tecnológicas. Assim, o isolamento de novas espécies de BMs é necessário para atingir às necessidades de diferentes áreas tecnológicas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Bioprospecção de BMs a partir de amostras de sedimento marinho do Canal de Cabo Frio.

3.2. Objetivos específicos

Coleta de testemunho no canal de Cabo Frio, fracionamento das camadas de sedimento e detecção de BMs;

Caracterização morfológica das BMs encontradas nas amostras logo após a coleta e aproximadamente 2 anos após a coleta;

Cultivo de BM em meio de cultura autotrófico e/ou heterotrófico;

Caracterização da(s) espécie(s) isoladas por microscopia óptica e eletrônica;

Metagenômica da cultura de obtida;

Mineração de genes marcadores filogenéticos e de genes relacionados à biomineralização.

4. Materiais e Métodos

4.1 Coleta de amostras

Testemunhos de sedimento de aproximadamente 1 metro foram coletados no canal de Cabo Frio ($22^{\circ}52'20''S$ $42^{\circ}01'23''W$), um canal com água do mar que conecta a Lagoa de Araruama ao oceano Atlântico, no litoral norte do Estado de Rio de Janeiro – Brasil (Figura 6). A chegada até os pontos de coleta das amostras foi feita com o auxílio de barco e o sedimento foi coletado com testemunho de policloreto de polivinila (PVC) à gravidade em três pontos do canal de Cabo Frio (Ponto CF_1: $22^{\circ}52'25''S$; $42^{\circ}00'54''O$; Ponto CF_2: $22^{\circ}52'24''S$; $42^{\circ}01'31''O$; Ponto CF_3: $22^{\circ}52'42''S$; $42^{\circ}00'22''O$). Cada testemunho de PVC foi fracionado em 15 centímetros e o sedimento foi transferido para recipientes de plástico de 1L para armazenamento no laboratório. As amostras foram coletadas no mês de setembro de 2021, em recipientes de plástico de tampa de rosca de 1 litro, preenchidos até 4/5 de sua capacidade com aproximadamente metade de sedimento e metade de água do mar artificial (BAZYLINSKI *et al.*, 2013). No dia da coleta, fatores abióticos da água do mar foram medidos com sonda multiparamétrica AK88 (AKSO, Brasil) (Tabela 2). São estes: (i) temperatura ($^{\circ}C$); (ii) potencial oxidação-redução (mV) (ORP, do inglês *oxidation reduction potential*); (iii) pH; (iv) oxigênio dissolvido (mg/L e %) (OD). A transparência foi medida com disco de Secchi (v) (m). As amostras coletadas foram transportadas a temperatura ambiente e protegidas da luz.

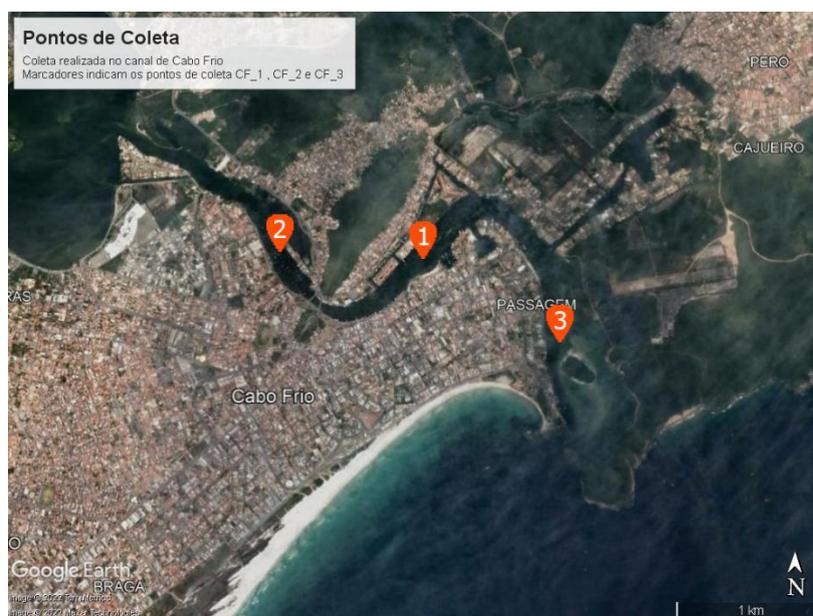


Figura 6. Imagem de satélite do canal de Cabo Frio, Cabo Frio, RJ. Balões vermelhos numerados de 1 a 3 indicam, respectivamente os pontos de coleta CF_1, CF_2 e CF_3 das amostras. Fonte: Google Maps - ©2022 Google.

Tabela 2. Medidas de fatores abióticos.

Sítio de coleta	Temp. (°C)	Prof. (m)	ORP (mV)	pH	OD (%)	Transp. (m)
CF_1	23,5	2,8	140.9	8,09	88.3	1,5
CF_2	24	1,5	131.4	8,12	102.4	1,5
CF_3	21,6	3,8	131,5	7,62	100.1	3,8

4.2 Prospecção de BMs nas frações de sedimento dos pontos de coleta

As amostras relativas às frações dos sedimentos dos testemunhos foram concentradas magneticamente de forma a selecionar BMs com direção de nado antiparalela ao campo magnético externo gerado por ímã de neodímio, isso é em direção ao norte magnético, fixado com fita crepe na parte externa do recipiente contendo o sedimento (LEFÈVRE *et al.*, 2010). Após 30 minutos alíquotas de 200 µL de água contendo células magnetotáticas foram recolhidas em tubos de polipropileno de 1,5 mL e concentradas novamente utilizando o pólo magnético norte de uma barra magnética.

Quando verificada a presença de BMs nessa amostra concentrada magneticamente do sedimento através de observação em microscópio óptico, foi usada a técnica do "racetrack" (Figura 7) (WOLFE *et al.*, 1987) para lavar e concentrar uma vez mais as BMs, evitando ao máximo a presença de bactérias não magnetotáticas (Figura 6). A técnica de "racetrack" visa a purificação de BM concentrada magneticamente. Nela a ponta estreita de uma pipeta Pasteur de vidro foi selada no bico de Bunsen e o capilar (comprimento, 1 a 9 cm) foi preenchido com água esterilizada do habitat usando uma agulha hipodérmica longa. Esse aparato artesanal foi autoclavado para garantir estar estéril antes da utilização. Assim, a amostra de BMs concentradas diretamente do sedimento com auxílio de um ímã foi transferida para o racetrack, sendo este exposto a campo magnético externo (ímã) com a polaridade adequada. As BMs migraram ao longo do racetrack em direção ao final da ponta capilar. Após 10 a 20 minutos a ponta contendo as BMs acumuladas foi quebrada. Usando uma agulha hipodérmica estéril, as BMs foram removidas e transferidas para a água do habitat esterilizada. Após 10 minutos, as células que alcançaram o extremo da pipeta Pasteur foram inoculadas na interface óxica-anóxica de tubos de cultura preenchidos até 4/5 do tubo com um meio semissólido com gradiente de concentração de oxigênio.

Após 15 dias, alíquotas de 2 μL de amostras concentradas magneticamente foram observadas através da técnica da gota pendente (SCHÜLER, 2002) (Figura 8) em microscópio óptico equipado para contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) (AxioImager D2; ZEISS, Oberkochen, Germany) acoplado com câmeras (AxioCam HRm e AxioCam MRc) (WENTER *et al.*, 2009). O comportamento magnetotático foi observado ao posicionar o pólo norte magnético do ímã voltado para a borda da gota.

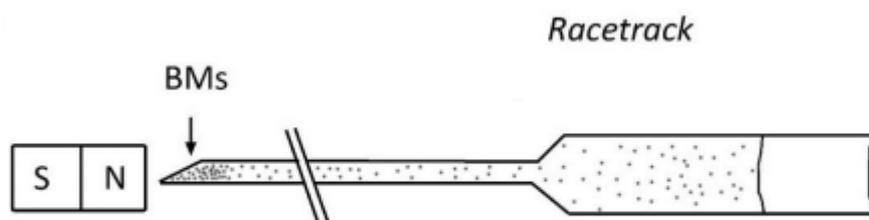


Figura 7. Representação da concentração de BMs pela técnica de “racetrack”. Figura de López (2014).

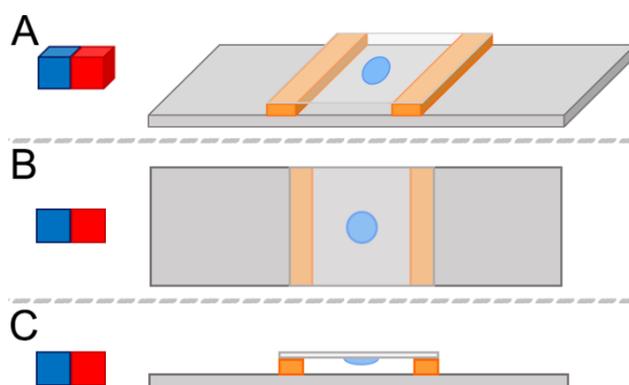


Figura 8. Ilustração da técnica de gota pendente. **A.** Vista topográfica da lâmina preparada. Espaçador (laranja) entre lâmina em lamínula somado ao baixo volume da gota (azul) garante que a mesma esteja pendente. **B.** Vista superior da gota pendente. **C.** Vista lateral da gota pendente. Ao lado encontra-se o ímã posicionado sobre a mesa do microscópio com o polo norte magnético (vermelho) voltado para a borda da gota que será observada. Figura de Taveira (2021).

As amostras obtidas após racetrack foram observadas por microscopia óptica para verificação da qualidade do enriquecimento magnético para inóculo nos meios de cultura, isso é verificação de ausência de bactérias que não respondiam ao campo magnético externo aplicado. Após a verificação, as amostras enriquecidas magneticamente foram inoculadas em meio de cultura semi-sólido EMSH heterotrófico e autotrófico, como descrito no próximo item.

4.3 Meios de cultura para BMs marinhas

Para o cultivo das BMs do Canal de Cabo Frio foi usado um meio semissólido heterotrófico com gradiente de O₂ (com fontes de carbono orgânico, acetato e succinato de sódio). O meio era composto por 3 g de Hepes, 1,26 g de bicarbonato de sódio, 0,25 g de NH₄Cl, 1 g de acetato de sódio, 1 g de succinato de sódio, 0,6 g de L-cisteína fresca, pH 7,0 (concentração final de 0,2 g/l), 0,2 ml de indicador de resazurina 0,2% e 2 g de Bacto ágar foram diluídos em 1 litro de água de mar artificial preparada como descrito por Bazylinski *et al.* (2013).

O meio foi autoclavado a 121 °C durante 20 min. Após o resfriamento, foram então adicionados ao meio 0,5 ml de solução de vitaminas, 2 ml de 0,01 M de quinato férrico, 4 ml de tiosulfato de sódio (40%), 5 ml de KHPO₄ (1,86%). O pH foi ajustado a 8,0 e foram adicionados ao meio 3 ml de solução de sais minerais de Wolfe. As células foram inoculadas após a formação do gradiente de oxigênio, o qual é gerado pela difusão do oxigênio no meio de cultivo evidenciado pelo indicador de resazurina. As culturas foram incubadas a 28 °C no escuro, até a formação da banda na interface óxica-anóxica (7 dias aproximadamente). No meio de cultura autotrófico as fontes de carbono fixadas foram omitidas. Os demais procedimentos foram realizados na mesma maneira descrita anteriormente para o inóculo em meio de cultura heterotrófico.

4.4 Caracterização morfológica da cultura de BM do canal de Cabo Frio

4.4.1 Microscopia óptica

Para determinar se as células apresentavam ou não magnetotaxia, uma alíquota de BMs em cultivo foram observadas em um microscópio óptico Axiovert (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). Com a ajuda de um ímã colocado no estágio do microscópio, foi possível observar o comportamento magnetotático nas bactérias que migraram para a borda da gota de água. Respostas imediatas de movimento em uma direção de nado preferencial em relação ao polo do ímã e resposta à inversão do campo foram utilizados na identificação de BMs e magnetotaxia.

Para observar a morfologia celular, imagens de microscopia de contraste interferencial diferencial de Nomarski foram obtidas em um microscópio Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado a uma câmera Zeiss AxioCamMR A10 (Carl Zeiss,

Göttingen, Alemanha). Para isso, foi usado o método da gota pendente. Um ímã comercial foi usado para direcionar os microrganismos magnetotáticos para a borda da gota.

4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão convencional e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM)

Para observação direta em microscopia eletrônica de transmissão convencional (MET), alíquotas das culturas que apresentaram BMs observadas por microscopia óptica foram depositadas sobre grades de cobre 300 *mesh* com filmes suporte de formvar e carbono. As grades foram secadas com papel filtro. As amostras foram observadas em no microscópio FEI Morgagni (FEI Company, Hillsboro, Holanda) operado a 80 kV equipado com câmera digital MegaView G2 (Olympus, Tokyo, Japão).

Para observação dos magnetossomos por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) foi utilizado o microscópio FEI TECNAI® G2 TF20 (FEI Company, Holanda) operado a 200 kV. A partir das imagens de HRTEM e aplicação da transformada rápida de Fourier (FFT) utilizando o software Digital Micrograph (Gatan Inc., Pleasanton, CA, EUA) obteve-se a distância interplanar entre os planos cristalinos. Esse valor foi então comparado com o da literatura por meio do software JEMS (STADELMANN, 2014) para confirmação do mineral que forma o cristal magnético.

4.4.3 Análise de imagens

Medidas de comprimento e largura das células ($n = 77$) e dos magnetossomos ($n = 473$) foram realizadas utilizando imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni em 80kV (FEI Company, Hillsboro, Holanda) o software iTEM-EFTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Alemanha). O tamanho do magnetossomo foi considerado como a média entre a largura e o comprimento do cristal. O fator de forma foi calculado dividindo a largura pelo comprimento. Para determinar a quantidade de por célula, os mesmos foram contados em 77 células e a média de magnetossomos por célula foi estabelecida.

4.4.4 Espectroscopia de raios X

Para realizar a análise de elementos das inclusões bacterianas e dos magnetossomos das BMs em estudo, as grades de microscopia preparadas anteriormente foram observadas, um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EX (Jeol, Peabody, MA, USA) equipado com um detector Noran para análise de raios-X por energia dispersiva – EDS (Thermo Scientific, Palm Beach, FL USA). Espectros de EDS foram obtidos usando 100 kV de energia e um tamanho de sonda de aproximadamente 80 nm de diâmetro (Oxford instruments, Abingdon, UK) e o software AZtec (Oxford instruments, Abingdon, UK) foi utilizado para obtenção de mapas dos elementos.

4.4.5 Metagenômica

4.4.5.1 Extração de DNA e sequenciamento

A extração de DNA foi feita utilizando o kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO's, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e 1 mL da cultura de enriquecimento contendo BMs. A pureza e concentração de ácidos nucleicos foram avaliadas usando um dispositivo NanoDrop 1000 (Thermo Fisher, EUA). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi preparado dissolvendo 0,3 g de agarose em 30 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA 1x (Ref: B49; Thermo Fisher, EUA) e aquecido. O gel foi corado usando 3 µL de SYBR SafeDNA Gel Stain (Ref: S33102, Invitrogen, EUA) e corrido em tampão TAE 1x. As condições da eletroforese foram US= 80 V e IS=350 mA durante 60 minutos. Como padrão de peso molecular foi utilizado 1kb DNA Ladder (Promega). Após o final da corrida o gel foi revelado em transiluminador (Transilluminator L-PIX; Loccus Biotecnologia, Brasil) sob luz U.V. em comprimento de onda de 300 nm. A amostra foi enviada para sequenciamento da empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba – São Paulo).

4.4.5.2 Sequenciamento de metagenoma

O sequenciamento foi realizado em um equipamento Illumina Nextseq 2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA). Os dados obtidos pelo NextSeq 2000 foram analisados na nuvem BaseSpace pelo programa BCL Convert (fornecido pela Illumina), que realiza o base call das imagens do sequenciamento, convertendo-as em sequências no formato fastq, com cada base acompanhada de um escore de qualidade Phred (EWING *et al.*, 1998). A avaliação

inicial das leituras brutas do sequenciamento foi feita com o programa FastQC versão 0.12.1 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). A filtragem das bases com qualidade baixa (escore Phred mínimo de qualidade 10, escore médio mínimo por leitura 15), das sequências de adaptadores e de vetores foi feita com o programa BBDuk, do pacote BBTools versão 38.94 (<http://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Leituras menores que 75 pares de bases após filtragem foram removidas.

4.6.2 Montagem do metagenoma

O metagenoma foi montado usando os programas metaSPAdes versão 3.15.5 (NURK *et al.*, 2017) e MEGAHIT versão 1.2.9 (LI *et al.*, 2015) utilizando as condições pré-estabelecidas nos programas. metaSPAdes é um pipeline para montagem de pequenos e médios genomas que executa vários passos em série, iniciando por correção de erros de sequenciamento nas leituras, construção de grafos de Brujin para diversos tamanhos de kmer, e por último, combinando os grafos para obtenção da montagem final dos contigs. Foram usadas as opções padrão do metaSPAdes, e contigs menores do que 500 pares de bases foram filtrados após a montagem. MEGAHIT é um programa para montagem de genomas e metagenomas computacionalmente extremamente eficiente, e também usa múltiplos kmers para a montagem do metagenoma. Foram usadas as opções padrão para MEGAHIT, mais os parâmetros “--presets meta-sensitive --min-contig-len 500”. Análises taxonômicas das leituras brutas foram realizadas utilizando Kraken2 e o banco de dados PlusPF (WOOD *et al.*, 2019) e Kaiju e os bancos de dados para RefSeq e NR (MENZEL *et al.*, 2016).

4.6.3 Compartimentalização de genomas

Para recuperar genomas a partir dos metagenomas (*metagenome-assembled genomes*, ou MAGs), foi usado o programa MetaBAT2 versão 2.15.0 (KANG *et al.*, 2019), que faz compartimentação do metagenoma em genomas individuais usando informações sobre cobertura de mapeamento e frequência de tetranucleotídeos dos contigs. Para obter a estimativa de cobertura, as leituras de sequenciamento foram mapeadas nas montagens feitas por metaSPAdes e MEGAHIT com minimap2 versão 2.24 (LI, 2018). Cada montagem (metaSPAdes e MEGAHIT) foi compartimentalizada separadamente, usando os parâmetros “--minContig 2000 --minCV 2”. Foi feita uma análise taxonômica preliminar dos MAGs

(contigs maiores do que 500 bp) foi feita utilizando a ferramenta BlobTools baseada em BLAST+ e no banco de dados (CHALLIS *et al.*, 2020) Em seguida, a totalidade dos MAGs recuperados foram dereplicados com dRep versão 3.4.2 (OLM *et al.*, 2017), usando as opções padrão. dRep usa CheckM (PARKS *et al.*, 2015) para avaliar a completude e contaminação de cada MAG, e usa Mash (ONDOV *et al.*, 2016) e FastANI (JAIN *et al.*, 2018) para estimar a similaridade entre os MAGs. Os MAGs são mantidos apenas se foram maiores do que 50 Kbp, completude estimada em pelo menos 75%, e contaminação de no máximo 20%. Para MAGs com mais de 99% de similaridade, apenas o MAG com melhor escore é mantido.

4.6.4 Anotação e análise dos MAGs quanto aos genes de biomineralização

Os MAGs foram carregados na plataforma RAST (AZIZ *et al.*, 2008), e as sequências de proteínas codificadas por possíveis genes de biomineralização foram identificadas pela análise bidirecional BLAST na própria plataforma. Nesta consulta foram utilizadas as proteínas codificadas pelos genes de biomineralização conservados *mamA*, *mamB*, *mamE*, *mamI*, *mamK*, *mamO*, *mamP* e *mamQ* das BMs: *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (AP007255) (MATSUNAGA *et al.*, 2005), *Ms. gryphiswaldense* cepa MRS-1 (AM085146) (LOHBE *et al.*, 2011), *Ms. magnetotacticum* cepa MS-1 (NZ_AAAP01003731) (BERTANI *et al.*, 2001), *Mc. marinus* cepa MC-1 (NC_008576) (SCHÜBBE *et al.*, 2009), *Mv. blakemorei* cepa MV-1 (FP102531) (JOGLER *et al.*, 2009) e gamaproteobactéria cepa SS-5 (AFX88983 – AFX88992) (LEFÈVRE *et al.*, 2013). Análises filogenéticas das sequências de aminoácidos das proteínas Mam concatenadas conservadas entre as BMs foram realizadas. A análise filogenética baseada nestas proteínas de biomineralização foram feitas no programa MEGA versão 11 (TAMURA *et al.*, 2021), utilizando o método de *Neighbor Joining*. O valor de Bootstrap foi calculado com 1000 réplicas.

5. Resultados

5.1 Detecção de BMs nas amostras ambientais

A observação direta de alíquotas de água intersticial das amostras obtidas nos três pontos de coleta no canal de Cabo Frio foi observado que apenas no ponto 1 de coleta e na profundidade de sedimento correspondente a 15-30 cm continha BMs. Apenas o comportamento de orientação magnética e nado do tipo sul foi observado nas BMs da amostra, o que definiu a polaridade magnética a ser utilizada na técnica de racetrack. Após a concentração magnética da amostra de água e sedimento dessa amostra foi observada uma grande diversidade morfológica de BMs, sendo cocos e espirilos os morfotipos mais abundantes (Figura 9A). Essa amostra foi utilizada nos experimentos subsequentes descritos neste trabalho durante 2021 e primeiro semestre de 2022 com o objetivo de se obter uma cultura de BM. No entanto, a amostra contendo sedimento e água foi mantida em laboratório a temperatura ambiente e o nível de água foi restabelecido em caso de evaporação pela adição de água destilada, uma vez que os sais forem concentrados após a evaporação. Em 2023, foi realizada no observação da amostra e vibriões magnetotáticos que não foram detectados inicialmente em 2021 passaram a ser o morfotipo dominante, senão o único morfotipo de BM presente na amostra (Figura 9B).

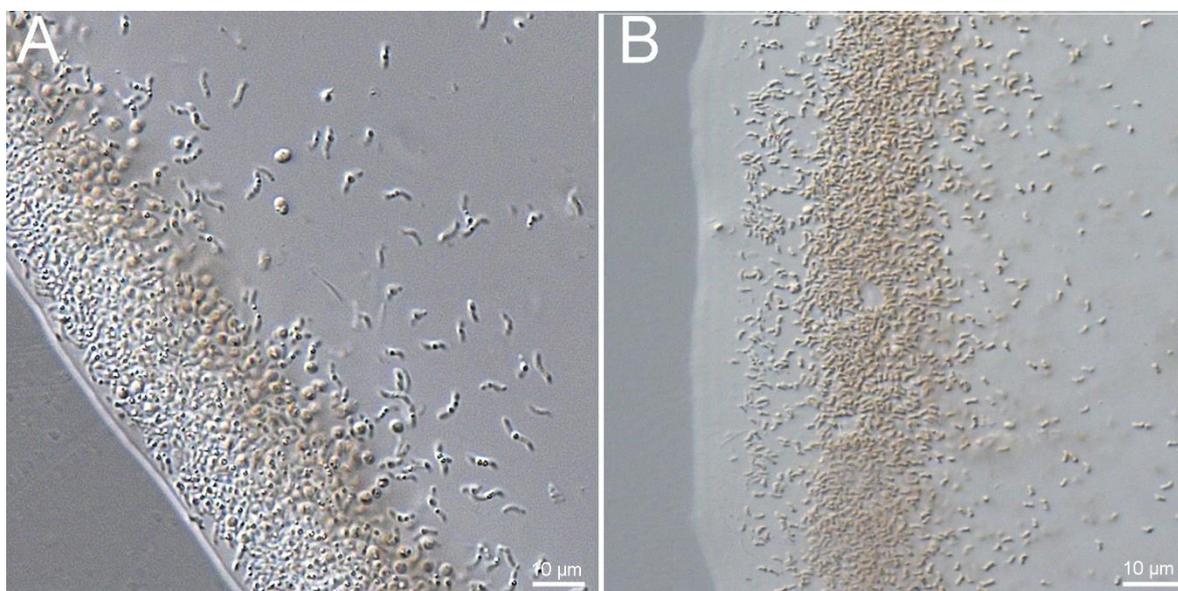


Figura 9. Comparação dos morfotipos de BMs observados na amostra ambiental por DIC. A. Amostra obtida por concentração magnética no final de 2021. B. Amostra obtida por concentração magnética no início de 2023. Note que amostra ambiental em 2021 (A) possuía grande número de cocos e espirilos magnetotáticos, enquanto que quando observada em 2023 (B), apenas vibriões magnetotáticos acumulam na borda da gota pendente.

5.2 Isolamento, cultivo e resposta magnética do bacilo magnetotático do canal de Cabo Frio

Após 7 dias do inóculo de amostras submetidas a concentração magnética com íma e purificação por racetrack foi observada uma banda na região de transição óxica-anóxica dos meios de cultura heterotróficos (Figura 10A). A observação de uma alíquota desse crescimento mostrou que se tratava de um bastonete magnetotático tipo sul (Figura 10B). A observação do tubo mostrou que a banda de células se tornou mais espessa ao longo do tempo, migrando para superfície do meio, o que indica o crescimento celular e necessidade de acesso a O₂. No entanto, a presença de uma bactéria não magnetotática foi observada por microscopia óptica conforme o crescimento celular no tubo aumentava (Figura 10C). Como forma de tentar eliminar a bactéria não magnetotática da amostra, a cada passagem de célula, repetições de purificação através da técnica de “racetrack” eram realizadas antes do inóculo da cultura mista de bastonetes magnetotáticos e células não magnetotáticas em meio semissólido heterotrófico com gradiente de O₂. A cultura mista foi mantida no laboratório por aproximadamente 6 meses, sendo que a passagem de células era feita de 15 em 15 dias. No entanto, ao final deste período, o crescimento de células não magnetotáticas superou o dos bastonetes de interesse. A reativação de culturas congeladas teve o mesmo resultado.

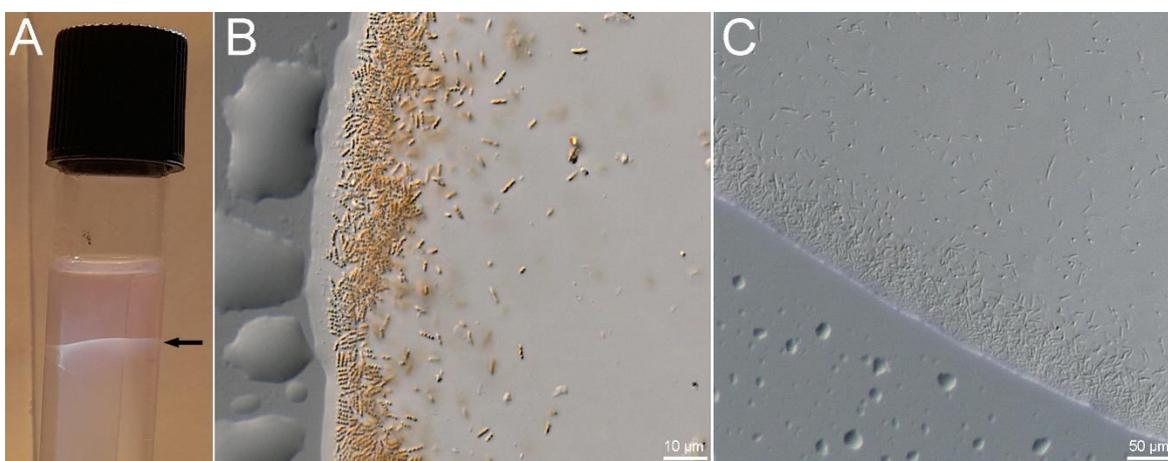


Figura 10. Cultivo de BM em meio semissólido heterotrófico com gradiente de O₂. A. Representação do crescimento da BM em banda no tubo contendo gradiente químico. B. Bastonete magnetotático tipo sul observado inicialmente nas culturas. C. Bactéria não magnetotática cujo crescimento superou o da célula de interesse.

5.3 Caracterização morfológica da BM na cultura mista

O bastonete magnetotático obtido na cultura mista do canal de Cabo Frio apresentou $2,99 \pm 1,34 \mu\text{m}$ de comprimento por $1,52 \pm 0,69 \mu\text{m}$ de largura ($n=77$) e um tufo de flagelos em um dos pólos da célula (Figura 11E). A observação da célula por MET mostrou que a

célula continha duas a quatro inclusões electron densas e duas cadeias de 7 ± 4 magnetossomos cada ($n = 77$; Figura 11A-D). O número de magnetossomos, e consequentemente, tamanho da cadeia de magnetossomos na mesma célula não foi simétrico, isso é, dentro de uma mesma célula, uma cadeia de magnetossomos tinha cinco, a outra tinha sete.

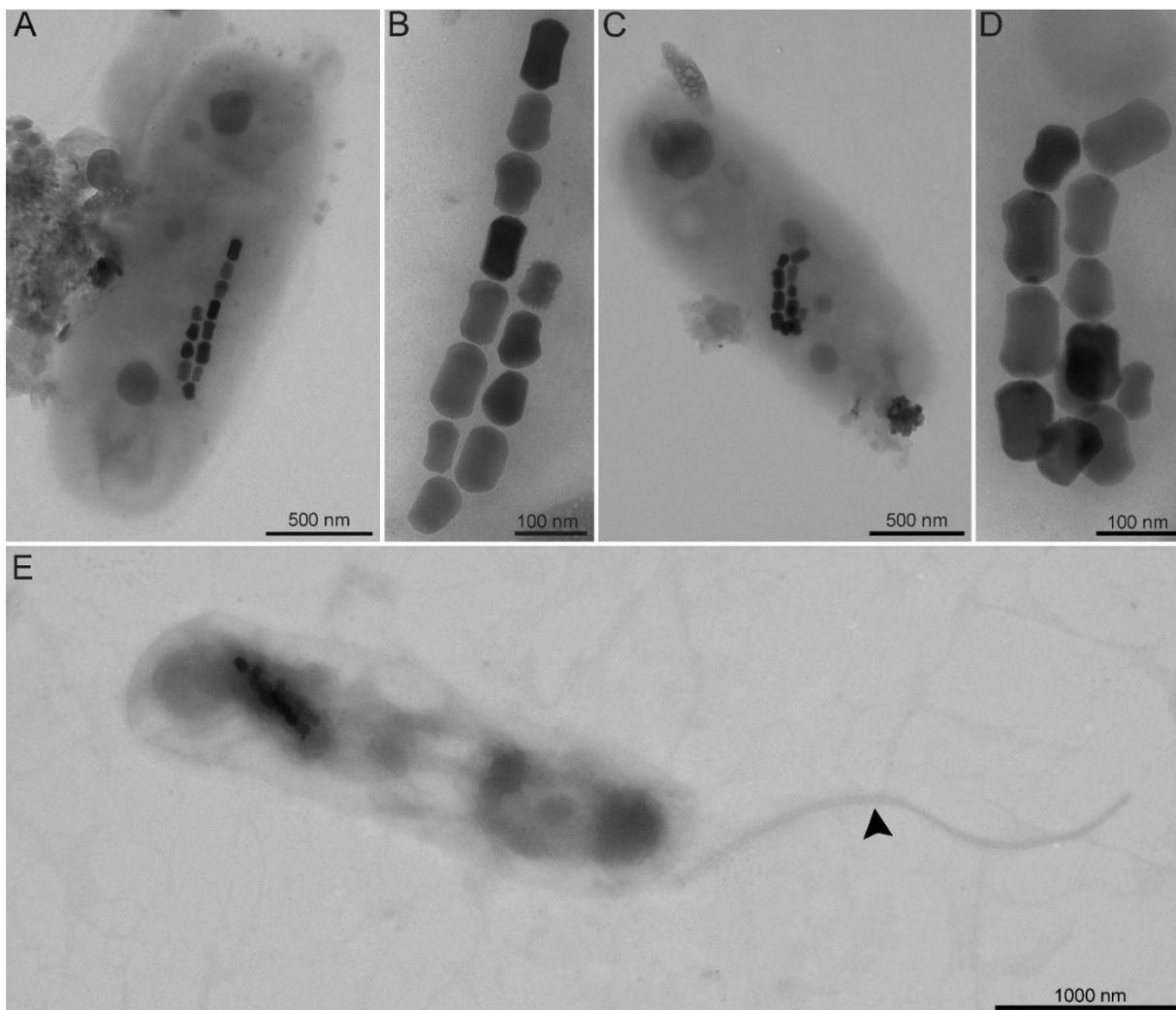


Figura 11. Imagens de MET dos bastonetes magnetotáticos obtidos na cultura mista. A e C. Bastonete com duas cadeias paralelas de magnetossomos prismáticos e duas inclusões eletrondensas. B e D. Cadeias de magnetossomos em detalhe. E. Célula contendo tufo de flagelos (cabeça de seta preta).

A forma dos magnetossomos observada foi prismática com 101 ± 20 nm e 71 ± 15 nm de comprimento e largura, respectivamente; o que resulta num tamanho médio de 86 ± 17 nm e um fator de forma médio de 0,7 ($n=77$; Figura 12). Magnetossomos com formas irregulares como ampulhetas, também foram observadas com frequência (Figura 12A; seta). Defeitos nos cristais magnéticos, como cristais geminados ou maclas, foram observados em 40% dos magnetossomos analisados. Em todas as imagens foi difícil a observação da

membrana do magnetossomo, mas uma fina camada eletrônica brilhante pode ser observada no magnetossomo indicado pela seta na Figura 12A, o que sugere que seja a membrana.

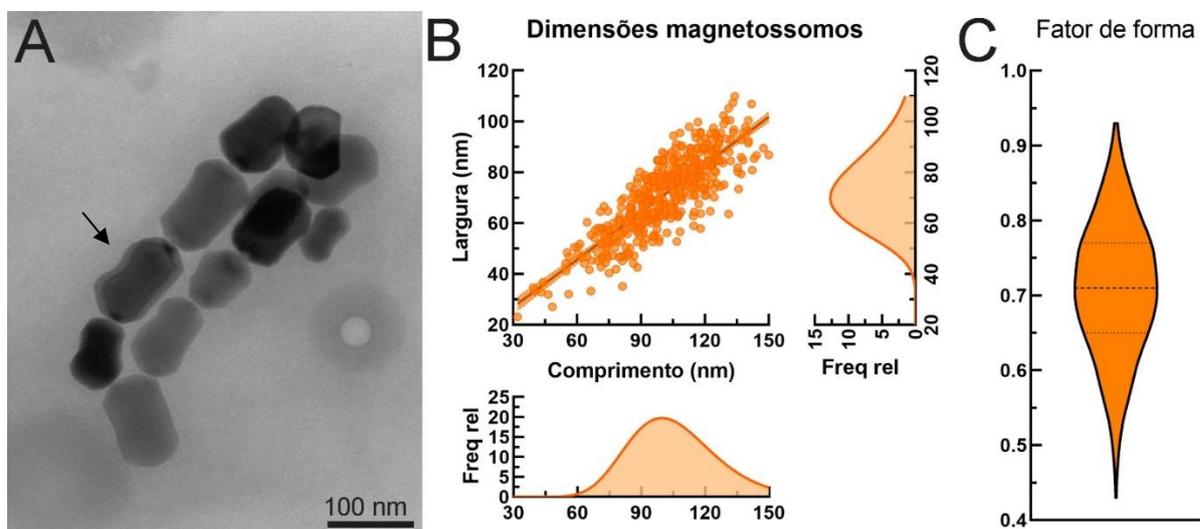


Figura 12. Dimensões e fator de forma dos magnetossomos dos bastonetes magnetotáticos do canal de Cabo Frio. A. MET da dupla cadeia de magnetossomos. B. Distribuição do tamanho dos magnetossomos. C. Distribuição do fator de forma dos magnetossomos. A seta em (A) indica um magnetossomo em forma de ampulheta no qual uma camada eletrônica brilhante pode ser observada ao redor do cristal, o que sugere que seja a membrana do magnetossomo.

A análise de elementos que compõem os magnetossomos por MET (Figura 13A e B) e EDS mostrou que os magnetossomos são formados por ferro (Figura 13C) e oxigênio (Figura 13D), não havendo a presença de enxofre (Figura 13E). O espectro de EDS confirma a presença de ferro e oxigênio e ausência de enxofre (Figura 13G). Por EDS foi verificada que os grânulos na célula são formados por fósforo (Figura 13F).

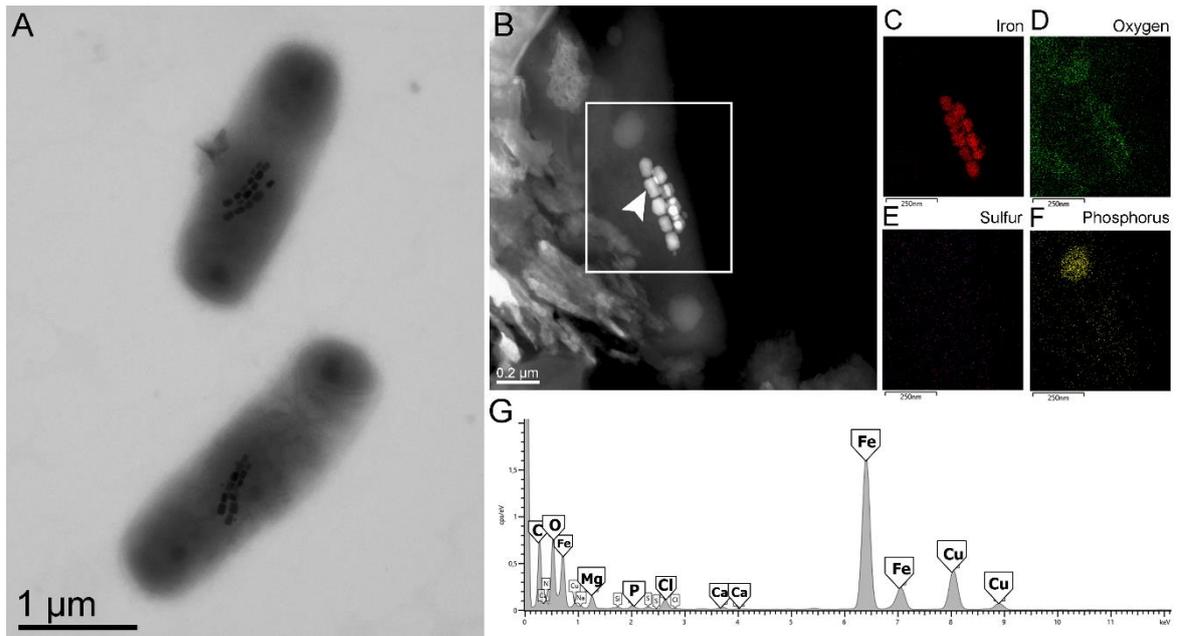


Figura 13. Mapa de elementos e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X. A. MET de dois bastonetes magnetotáticos do canal de Cabo Frio. B. Quadrado branco indica a região onde foi feita a análise de elementos C. Sinal do ferro (Fe) na amostra. D. Sinal do oxigênio (O). E. Sinal do enxofre (S) F. Sinal do fósforo (P). G. Espectro de EDS do magnetossomo indicado com cabeça de seta branca em B. O sinal do Cu provém da grade de microscopia, os sinais do Fe e O se destacam.

A análise dos magnetossomos por HRTEM permitiu a observação dos planos cristalinos da porção mineral dos magnetossomos (Figura 14), e também a melhor visualização de defeitos como bordas indefinidas e maclas (Figura 14B). Transformadas de Fourier obtidas das imagens dos magnetossomos do bastonete magnetotático de Cabo Frio avaliados por HRTEM geraram dados das medidas de distância e ângulos que foram indexados no sistema cúbico para magnetita (Figura 14C).

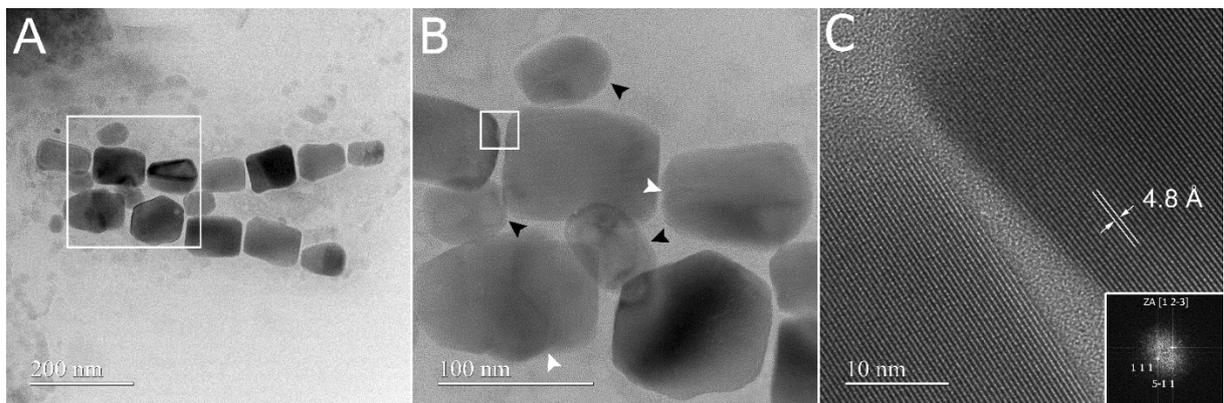


Figura 14. Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) de cadeia de magnetossomos do bastonete do canal de Cabo Frio/RJ. A. Imagem da dupla cadeia de cristais; B. Imagem de cristais da região delimitada por quadrado branco em “A”, cabeças de seta preta indicam pequenos cristais com bordas indefinidas e cabeças de seta branca indicam maclas. C. Imagem de parte de dois cristais da região delimitada por quadrado branco em “B”, o espaçamento dos planos mostrado entre as setas brancas é de 4,8 Å, consistente com o espaçamento (1 1 1) da magnetita (A inserção no canto inferior direito

mostra a Transformada Rápida de Fourier (FFT) com planos indexados e eixo de zona também compatíveis com a magnetita).

5.4 Análise metagenômica da cultura mista

O sequenciamento gerou um total de 1.972.905.718 bases. A filtragem de qualidade e dos adaptadores resultou na remoção de 2,7% das leituras (4,1% das bases). A análise taxonômica dos MAGs obtidos após montagem das sequências nos programas metaSPAdes e MEGAHIT mostrou a presença de sequências pertencentes a três filos principais. Os filos Pseudomonadota, Bacteriodota e Mycoplasmodota se destacaram devido a boa cobertura atingida na análise taxonômica dos MAGs obtidos pelo MEGAHIT e metaSPAdes (Figura 15 e 16). No entanto, se considerarmos os grupos nos quais as sequências foram agrupadas, o grupo com maior percentual de sequências é aquele no qual não foi atribuído qualquer afiliação de acordo com o banco de dados analisado (Tabela 3). A tabela 3 mostra informações sobre todos os MAGs obtidos com ambos os programas.

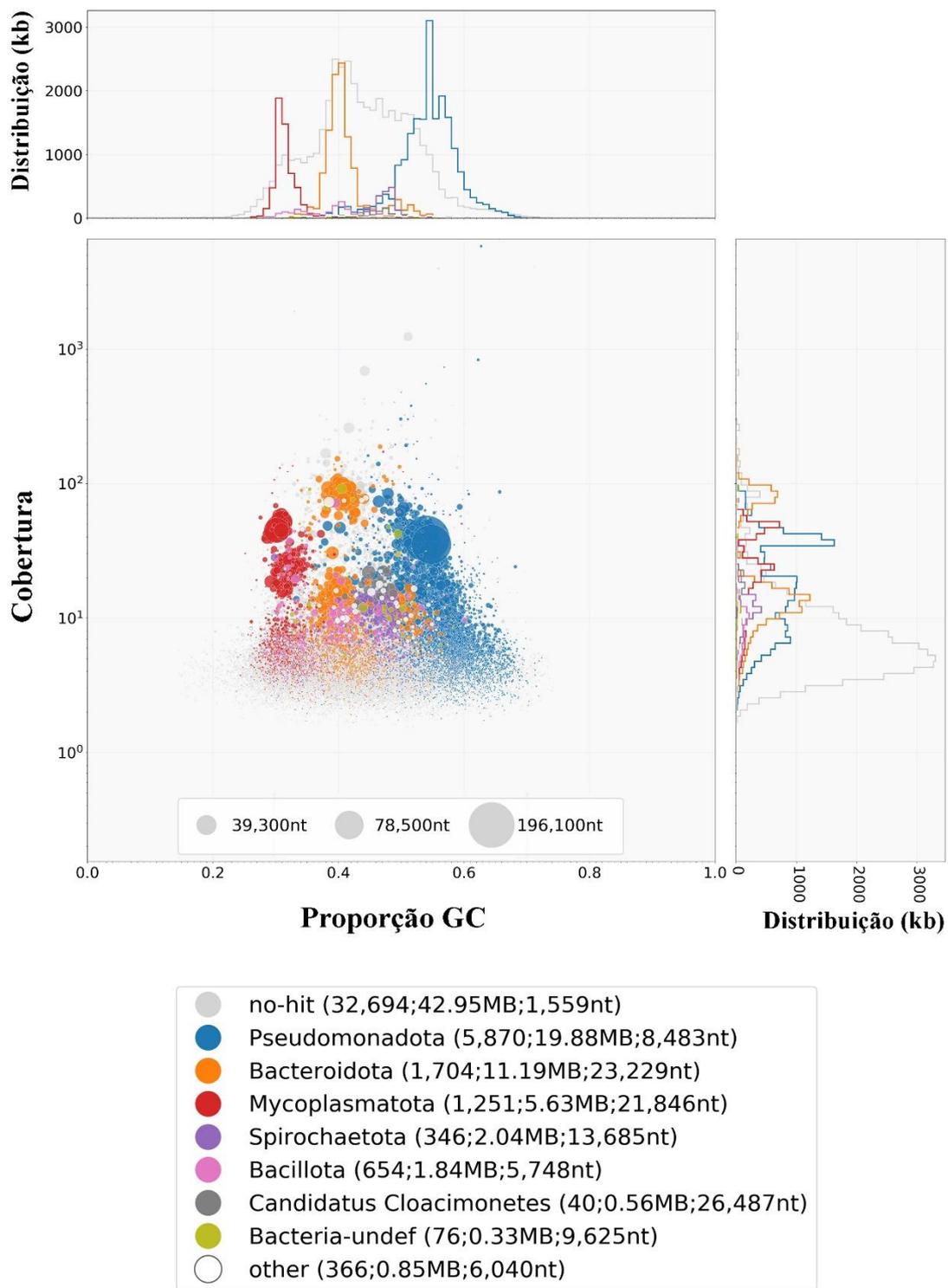


Figura 15. Análise taxonômica. Distribuição dos MAGs montados pelo programa MEGAHIT de acordo com a análise taxonômica, mostrando o tamanho, proporção GC e cobertura das sequências obtidas.

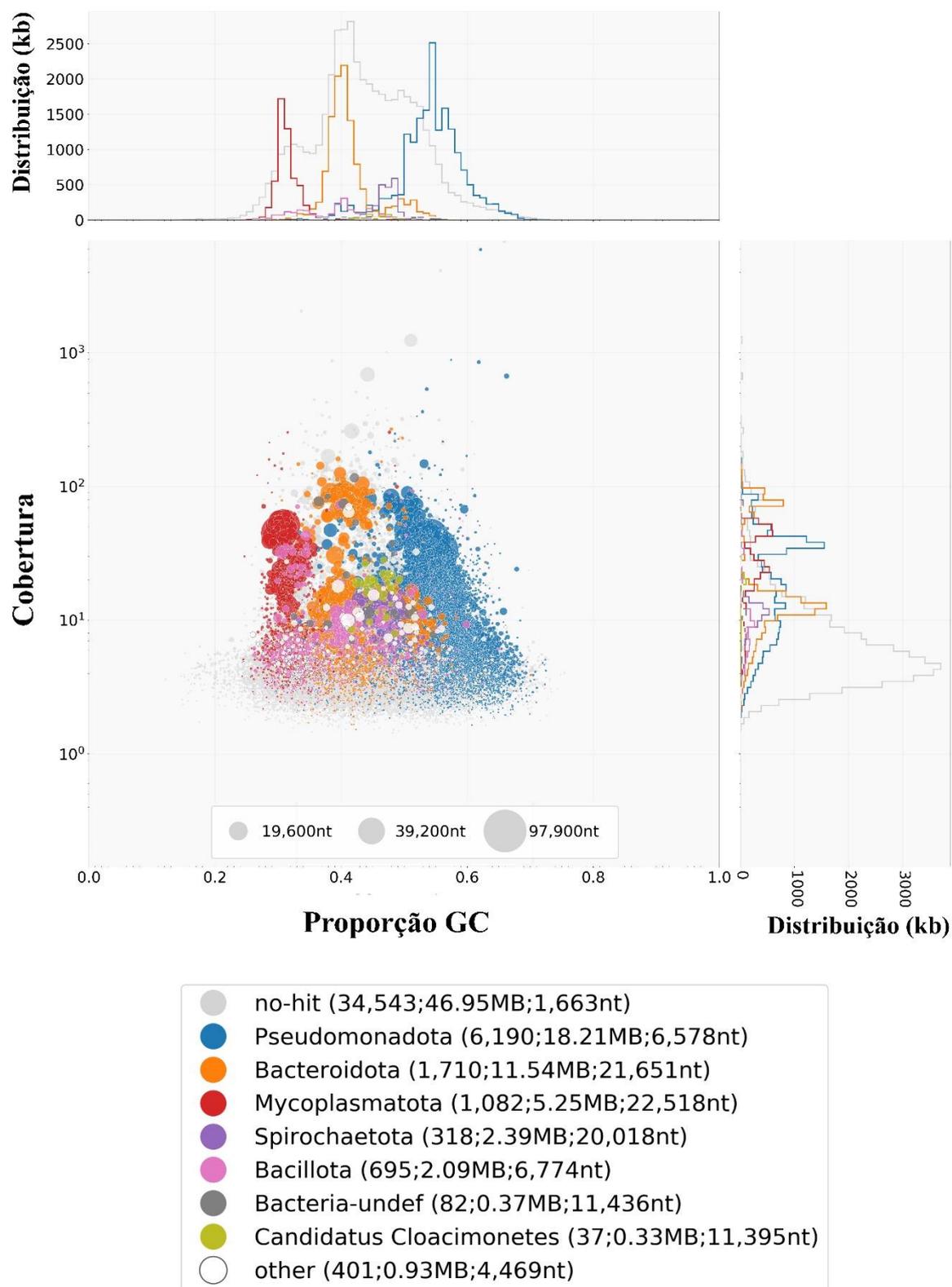


Figura 16. Análise taxonômica. Distribuição dos MAGs montados pelo programa metaSPAdes de acordo com a análise taxonômica, mostrando o tamanho, proporção GC e cobertura das sequências obtidas.

Tabela 3. Percentual de sequências montadas pelo programa MEGAHIT e metaSPAdes em cada grupo taxonômico.

Filo	MEGAHIT (%)	metaSPAdes
Sem Resultado	30,18	32,77
Pseudomonadota	23,53	23,18
Bacteriodota	17,10	15,08
Mycoplasmadota	8,10	8,03
Spirochaetota	1,19	1,33
Bacillota	1,15	1,20
Candidatos Cloacimonetes	0,51	0,58
Bacteria-indefinido	0,49	0,29
Outros	0,73	0,56

Detalhes sobre cada um dos MAGs estão descritos na tabela 4. A análise das MAGs obtidas na plataforma RAST permitiu a separação das regiões codificantes em diferentes categorias (Tabela 5). A classificação filogenética atribuída às MAGs pela plataforma estão listadas na tabela 5.

Tabela 4. Informações gerais sobre MAGs.

MAGs	Tamanho	Conteúdo GC	N50	L50	Nº de contigs
megahit 17	2,294,961	54.2	242918	2	9
megahit 18	3,937,450	40.8	33577	37	226
megahit 5	1,643,419	32.7	10101	38	234
megahit 7	1,682,531	31.4	21894	24	134
megahit 8	2,201,679	46.8	15186	46	218
metaspades 1	2,161,941	40.7	7714	73	386
metaspades 16	7,827,254	39.0	20307	106	725
metaspades 2	3,096,268	46.8	20472	47	261
metaspades 3	3,344,696	41.2	11394	85	437
megahit 16	1,780,642	30.5	78580	6	39
metaspades 22	5,044,809	51.3	12655	107	642

Tabela 5. Informações sobre regiões codificantes dos MAGs.

MAGs	Número de RNAs	Número de sequências codificantes	Bactéria mais próxima	Filo
megahit 17	41	2311	<i>Nitratiruptor</i> sp. SB155-2	Proteobacteria
megahit 18	52	3322	<i>Robiginitalea biformata</i> HTCC2501	Bacteroidota
megahit 5	-	-	<i>Turicibacter</i> sp. HGF1	Bacillota
megahit 7	42	1322	<i>Acholeplasma laidlawii</i> PG-8A	Micoplasmata
megahit 8	-	-	<i>Cloacamonas acidaminovorans</i>	Cloacimonadota
metaspades 1	136	4625	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> QYMF	Bacillota
metaspades 16	14	3897	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	Bacteroidota
metaspades 2	52	2769	<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405	Spirochaetota
metaspades 3	99	4834	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI 5482	Bacteroidota
megahit 16	-	-	<i>Turicibacter</i> sp. PC 909	Firmicutes
metaspades 22	65	2052	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	Bacteroidota

A análise de homologia (best hit bidirecional) entre o conteúdo das MAGs e genes *mam* conservados permitiu a identificação de quadros de leitura aberta (ORF; open reading frame) com potencial participação na biomineralização de magnetossomos (Tabela 6). Apesar de terem sido encontrados ORFs com homologia a genes *mam*, a organização destas ORFs não seguiu a sintenia dos genes de biomineralização descrita para BMs (Figura 3).

Tabela 6. Resultado do best hit bidirecional na busca por genes conservados de biomineralização.

Genes	MAGs	Score bits	E Value	Identities	Positives	Gaps
mam A	megahit 17	40	4,00E-05	31%	46%	-
	megahit 18	53	3,00E-09	22%	41%	12%
	megahit 5	30	0,05	32%	50%	16%
	megahit 7	27	0,42	34%	62%	-
	megahit 8	38	1,00E-04	21%	45%	5%
	metaSPAdes 1	32	0,014	30%	50%	14%
	metaSPAdes 16	47	8,00E-07	20%	45%	3%
	metaSPAdes 2	40	6,00E-05	29%	44%	-
metaSPAdes 3	59	3,00E-11	31%	60%	-	

	megahit 16	29	0.10	28%	50%	8%
	metaSPAdes 22	55	6,00E-10	19%	45%	2%
mam B	MAGs	Score bits	E Value	Identities	Positives	Gaps
	megahit 17	70	4,00E-15	25%	49%	4%
	megahit 18	109	4,00E-29	28%	52%	2%
	megahit 5	129	1,00E-36	28%	49%	2%
	megahit 7	96	2,00E-24	24%	50%	2%
	megahit 8	116	1,00E-31	28%	52%	2%
	metaSPAdes 1	99	2,00E-25	26%	54%	1%
	metaSPAdes 16	120	5,00E-33	33%	55%	0%
	metaSPAdes 2	151	4,00E-45	28%	57%	1%
	metaSPAdes 3	134	1,00E-38	27%	52%	1%
	megahit 16	127	5,00E-36	28%	49%	1%
metaSPAdes 22	104	4,00E-28	27%	52%	3%	
mam E	MAGs	Score bits	E Value	Identities	Positives	Gaps
	megahit 17	132	7,00E-37	37%	56%	7%
	megahit 18	140	4,00E-39	40%	57%	7%
	megahit 5	74	1,00E-16	33%	54%	5%
	megahit 7	56	2,00E-10	31%	50%	14%
	megahit 8	118	3,00E-33	37%	59%	4%
	metaSPAdes 1	27	0.52	32%	55%	24%
	metaSPAdes 16	127	2,00E-34	37%	57%	5%
	metaSPAdes 2	116	4,00E-31	36%	58%	10%
	metaSPAdes 3	121	1,00E-32	40%	60%	4%
	megahit 16	87	3,00E-21	32%	56%	8%
metaSPAdes 22	122	9,00E-33	43%	61%	6%	
mam I	MAGs	Score bits	E Value	Identities	Positives	Gaps
	megahit 17	25	0.31	32%	54%	4%
	megahit 18	34	3,00E-04	35%	48%	5%
	megahit 5	26	0.070	56%	65%	-
	megahit 7	24	0.69	40%	53%	-
	megahit 8	23	0.92	50%	72%	-
	metaSPAdes 1	25	0.28	35%	56%	12%
	metaSPAdes 16	24	3.1	29%	44%	1%
	metaSPAdes 2	23	1.9	35%	52%	5%
	metaSPAdes 3	25	0.50	21%	50%	-
	megahit 16	23	1.5	33%	54%	-
metaSPAdes 22	26	0.32	28%	52%	-	
mam K	MAGs	Score bits	E Value	Identities	Positives	Gaps
	megahit 17	58	2,00E-10	24%	46%	13%
	megahit 18	42	5,00E-05	25%	39%	18%
	megahit 5	29	0.19	20%	43%	13%
	megahit 7	28	0.25	29%	43%	2%
	megahit 8	41	4,00E-05	23%	41%	17%
	metaSPAdes 1	32	0.017	30%	50%	9%
metaSPAdes 16	45	5,00E-06	28%	41%	19%	

	metaSPAdes 2	63	5,00E-12	24%	46%	10%
	metaSPAdes 3	50	7,00E-08	24%	43%	15%
	megahit 16	28	0.54	21%	42%	18%
	metaSPAdes 22	36	0.004	25%	42%	15%
mam M	MAGs	Score bits	E Value	Identities	Positives	Gaps
	megahit 17	60	1,00E-11	25%	46%	0%
	megahit 18	104	5,00E-27	28%	54%	0%
	megahit 5	129	1,00E-36	27%	53%	1%
	megahit 7	93	3,00E-23	25%	50%	5%
	megahit 8	119	2,00E-32	27%	52%	1%
	metaSPAdes 1	98	1,00E-24	27%	51%	4%
	metaSPAdes 16	111	2,00E-29	27%	50%	1%
	metaSPAdes 2	118	3,00E-32	29%	53%	4%
	metaSPAdes 3	114	1,00E-30	27%	51%	2%
	megahit 16	124	1,00E-34	27%	53%	3%
	metaSPAdes 22	112	7,00E-30	27%	52%	3%
mam O	MAGs	Score bits	E Value	Identities	Positives	Gaps
	megahit 17	63	1,00E-11	28%	50%	3%
	megahit 18	72	4,00E-14	26%	51%	4%
	megahit 5	43	2,00E-05	26%	41%	18%
	megahit 7	35	0.004	28%	52%	5%
	megahit 8	57	2,00E-10	28%	51%	8%
	metaSPAdes 1	31	0.16	37%	51%	5%
	metaSPAdes 16	67	4,00E-12	26%	52%	4%
	metaSPAdes 2	54	9,00E-09	26%	50%	4%
	metaSPAdes 3	62	4,00E-11	25%	48%	5%
	megahit 16	28	0.11	35%	56%	24%
	metaSPAdes 22	65	1,00E-11	24%	49%	5%
mam P	MAGs	Score bits	E Value	Identities	Positives	Gaps
	megahit 17	37	7,00E-04	29%	56%	3%
	megahit 18	31	0.091	31%	53%	-
	megahit 5	26	1.2	24%	44%	-
	megahit 7	28	0.26	33%	43%	9%
	megahit 8	35	0.001	34%	63%	-
	metaSPAdes 1	28	0.22	24%	36%	26%
	metaSPAdes 16	32	0.083	27%	48%	5%
	metaSPAdes 2	34	0.006	31%	52%	13%
	metaSPAdes 3	27	1.5	33%	43%	21%
	megahit 16	29	0.11	32%	54%	2%
	metaSPAdes 22	33	0.026	27%	52%	2%
mam Q	MAGs	Score bits	E Value	Identities	Positives	Gaps
	megahit 17	25	2.9	30%	52%	3%
	megahit 18	84	3,00E-20	34%	48%	11%
	megahit 5	69	2,00E-15	22%	49%	11%
	megahit 7	50	9,00E-09	24%	41%	13%
	megahit 8	77	9,00E-18	30%	50%	9%

metaSPAdes 1	83	3,00E-20	28%	46%	14%
metaSPAdes 16	92	3,00E-23	30%	48%	10%
metaSPAdes 2	47	2,00E-07	23%	40%	17%
metaSPAdes 3	101	4,00E-27	33%	55%	8%
megahit 16	46	2,00E-07	23%	43%	14%
metaSPAdes 22	84	2,00E-20	31%	46%	9%

Análises filogenéticas com base na sequência de aminoácidos codificadas nas ORFs indicaram história evolutiva comum a dos genes *mam* descritos em BMs, isso é as sequências encontradas nos diferentes MAGs possuem ancestral comum aos das sequências descritas em diferentes BMs. (Figura 17-24). Por exemplo, na análise evolutiva realizada com MamA é possível notar que as sequências descritas nos MAGs metaSPAdes 1 e 2 dividem ancestral comum com BM afiliada ao filo *Candidatus* Omnitrofica; a sequência encontrada no megahit 8 aparece relacionada a deltaproteobactérias magnetotáticas produtoras de magnetita; metaSpades 16, 22, 3 e megahit 18 estão proximamente relacionadas a BMs pertencentes ao filo Nitrospirae; já as sequências de megahit 5, 7, 16 e 17 dividem ancestral com proteínas MamA relacionados a biomineralização de greigita em deltaproteobactérias magnetotáticas (Figura 17). Já na análise filogenética utilizando as proteínas identificadas com homologia a MamB, as sequências codificadas nos MAGs encontrados não apresentaram proximidade com as sequências MamB de BMs, sendo agrupadas como *outgroup* na árvore filogenética (Figura 18). No caso da análise filogenética baseadas em MamE e MamO, a maior parte das proteínas codificadas pelas ORFs identificadas nas MAGs, agrupa com proteobactérias magnetotáticas, exceto por possíveis MamE e MamO encontrada na MAG denominada metaSPAdes 1, que agrupa com proteínas de BMs afiliadas a Deltaproteobacteria e Nitrospirae, respectivamente (Figuras 19 e 20). No caso da filogenia baseada em MamI encontramos sequencias relacionadas a BMs pertencentes a Nitrospirae (metaSPAdes 3, 22 e 16), Deltaproteobacteria (megahit 8 e metaSPAdes 1), Alphaproteobacteria (megahit 7, metaSPAdes 2, megahit 9, megahit 18 e megahit 17) (Figura 21). Proteínas codificadas por OFRs com homologia a MamP mostraram ancestral comum com deltaproteobactérias magnetotáticas, exceto por aquelas encontradas em megahit 5, megahit7 e mataspades 1, que foram posicionadas como *outgroup* (Figura 22). No caso da análise filogenética baseadas em MamQ e MamM, a maior parte das proteínas codificadas pelas ORFs identificadas nas MAGs, agrupa com proteobactérias magnetotáticas, exceto pelas sequências identificadas na MAG denominada megahit 17 e megahit 16, que foram posicionadas como *outgroup*, respectivamente (Figuras 23 e 24).

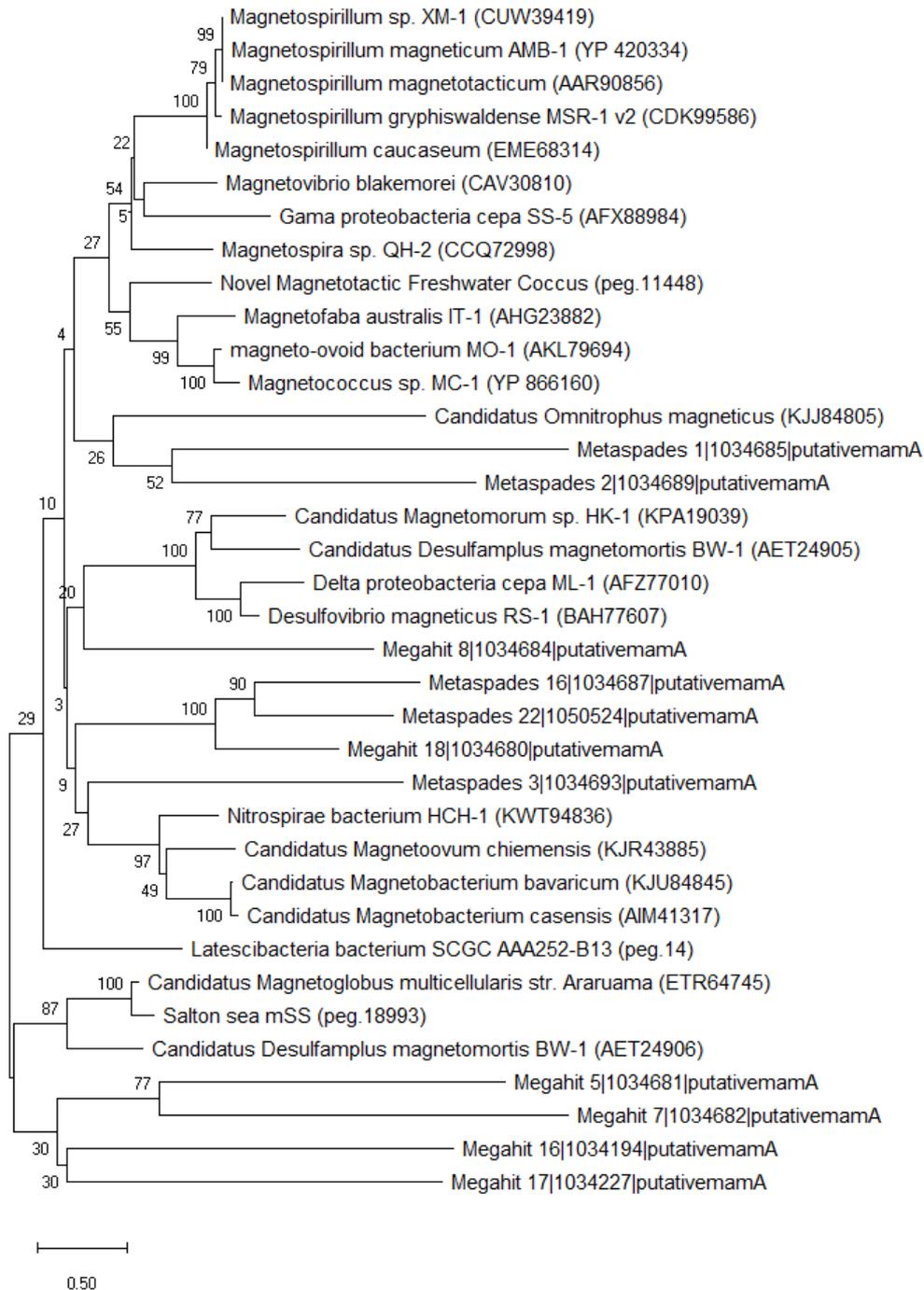


Figura 17. Árvore filogenética baseada em MamA. A análise filogenética foi feita pelo método de Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância evolutiva em substituições de aminoácido por sítio.

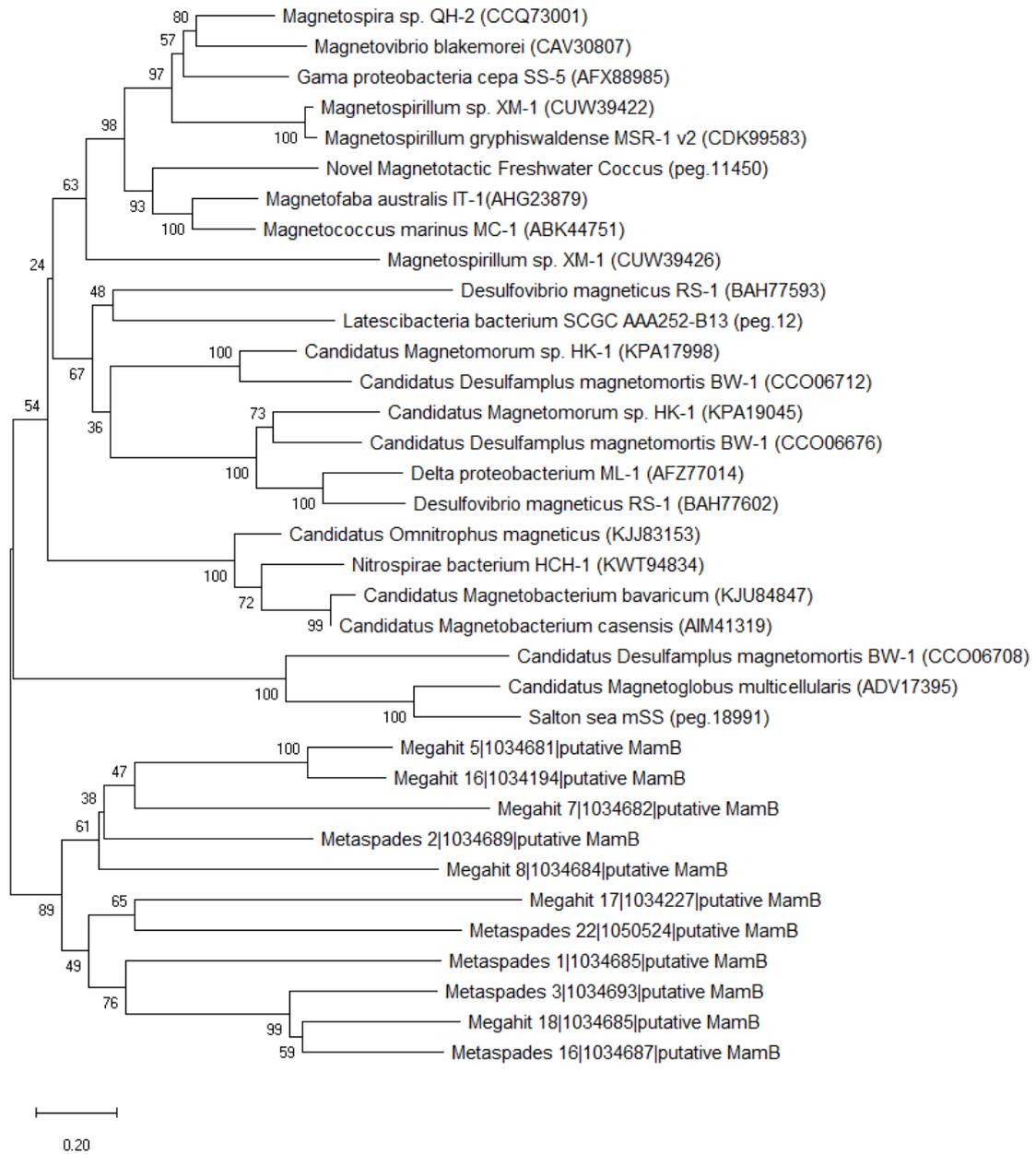


Figura 18. Árvore filogenética baseada em MamB. A análise filogenética foi feita pelo método de Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância evolutiva em substituições de aminoácido por sítio.

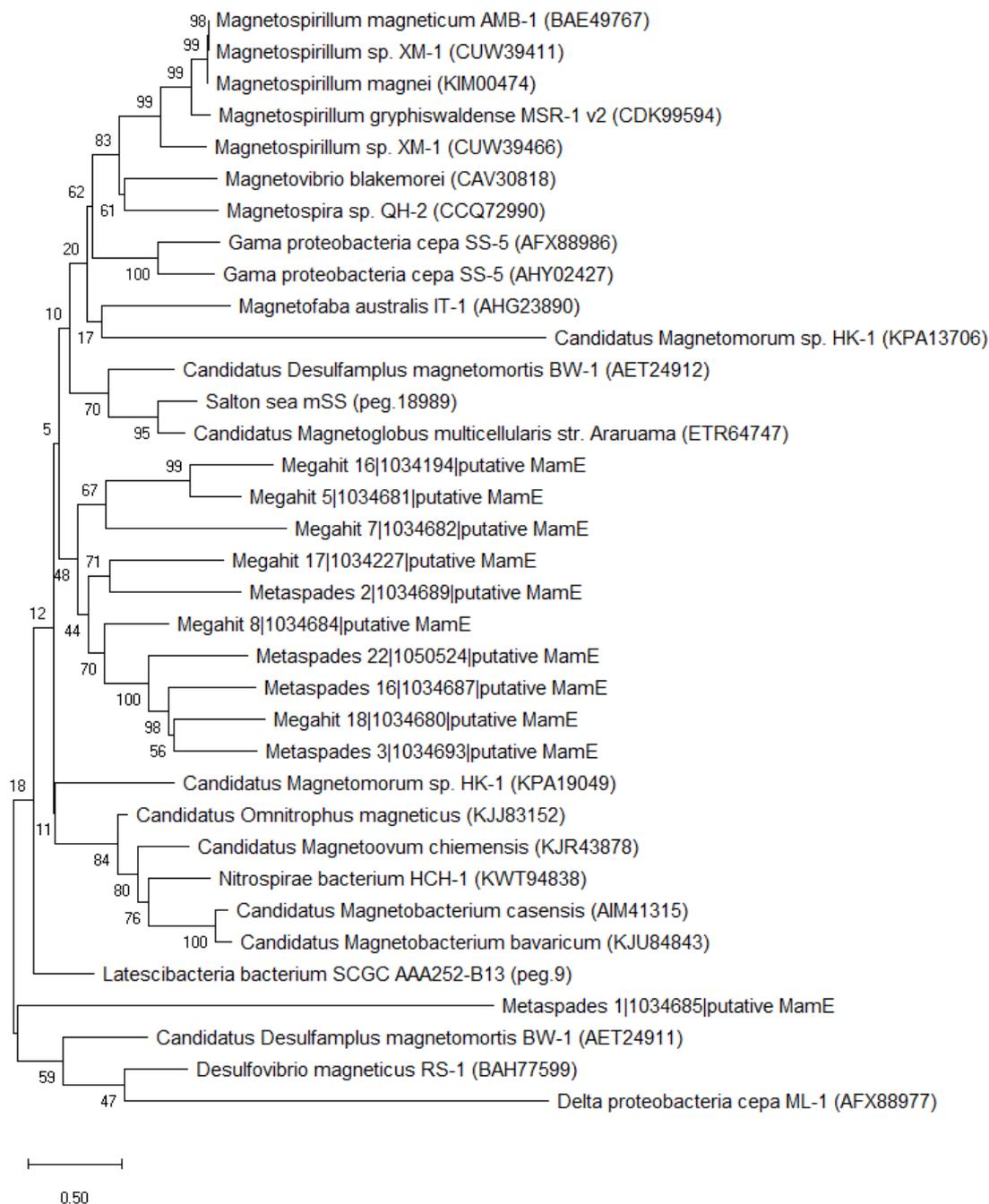


Figura 19. Árvore filogenética baseada em MamE. A análise filogenética foi feita pelo método de Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância evolutiva em substituições de aminoácido por sítio.

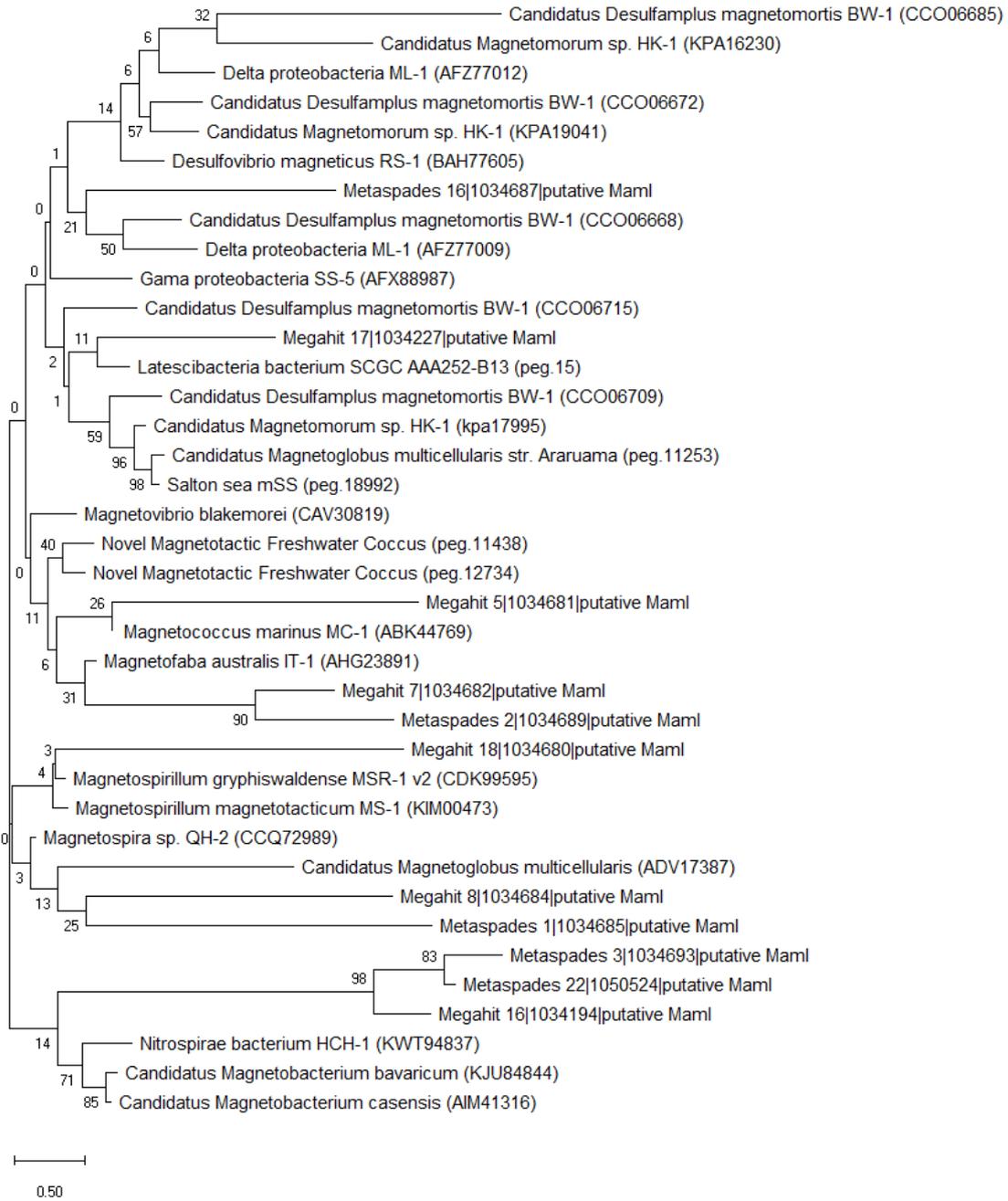


Figura 20. Árvore filogenética baseada em Maml. A análise filogenética foi feita pelo método de Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância evolutiva em substituições de aminoácido por sítio.

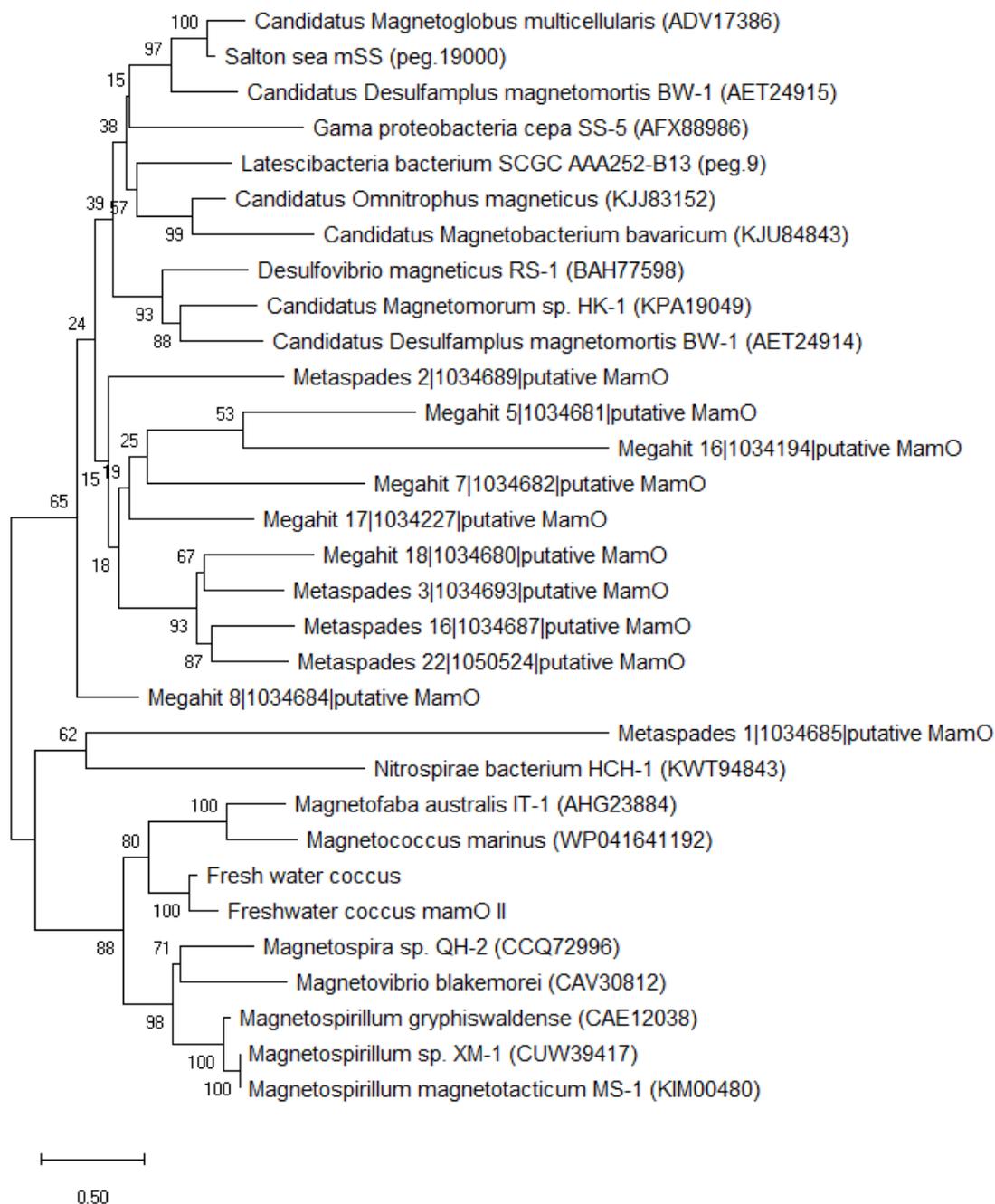


Figura 21. Árvore filogenética baseada em MamO. A análise filogenética foi feita pelo método de Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância evolutiva em substituições de aminoácido por sítio.

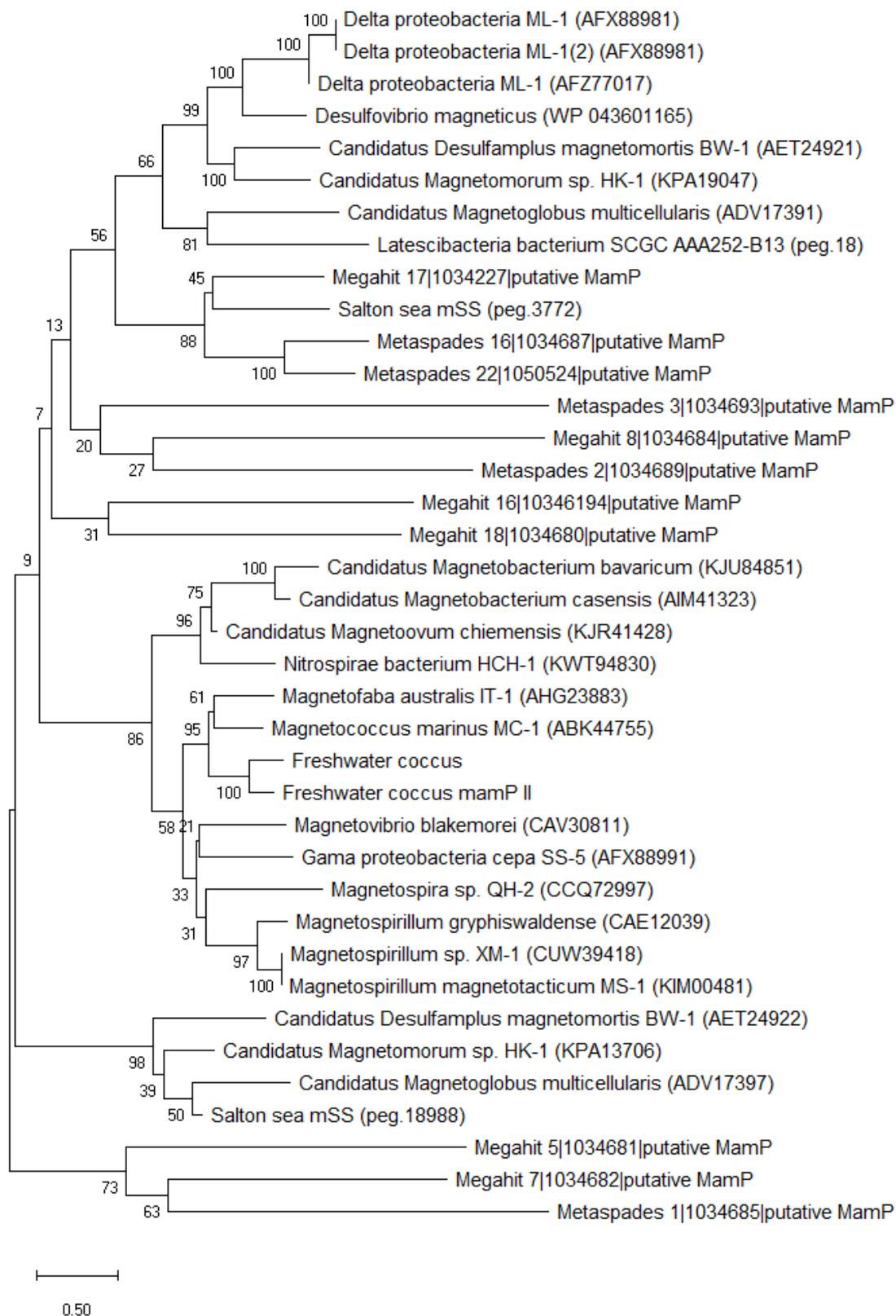


Figura 22. Árvore filogenética baseada em MamP. A análise filogenética foi feita pelo método de Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância evolutiva em substituições de aminoácido por sítio.

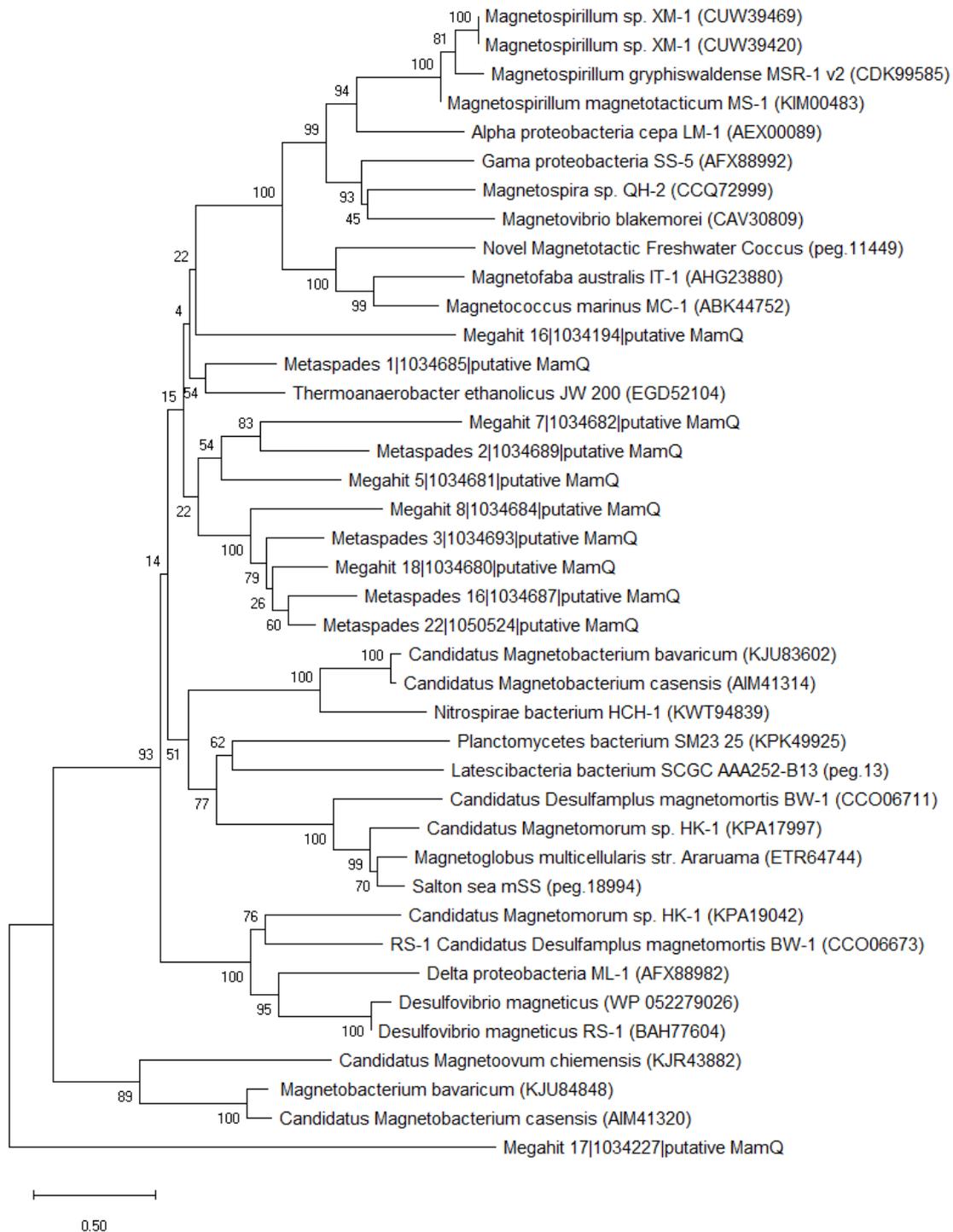


Figura 23. Árvore filogenética baseada em MamQ. A análise filogenética foi feita pelo método de Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância evolutiva em substituições de aminoácido por sítio.

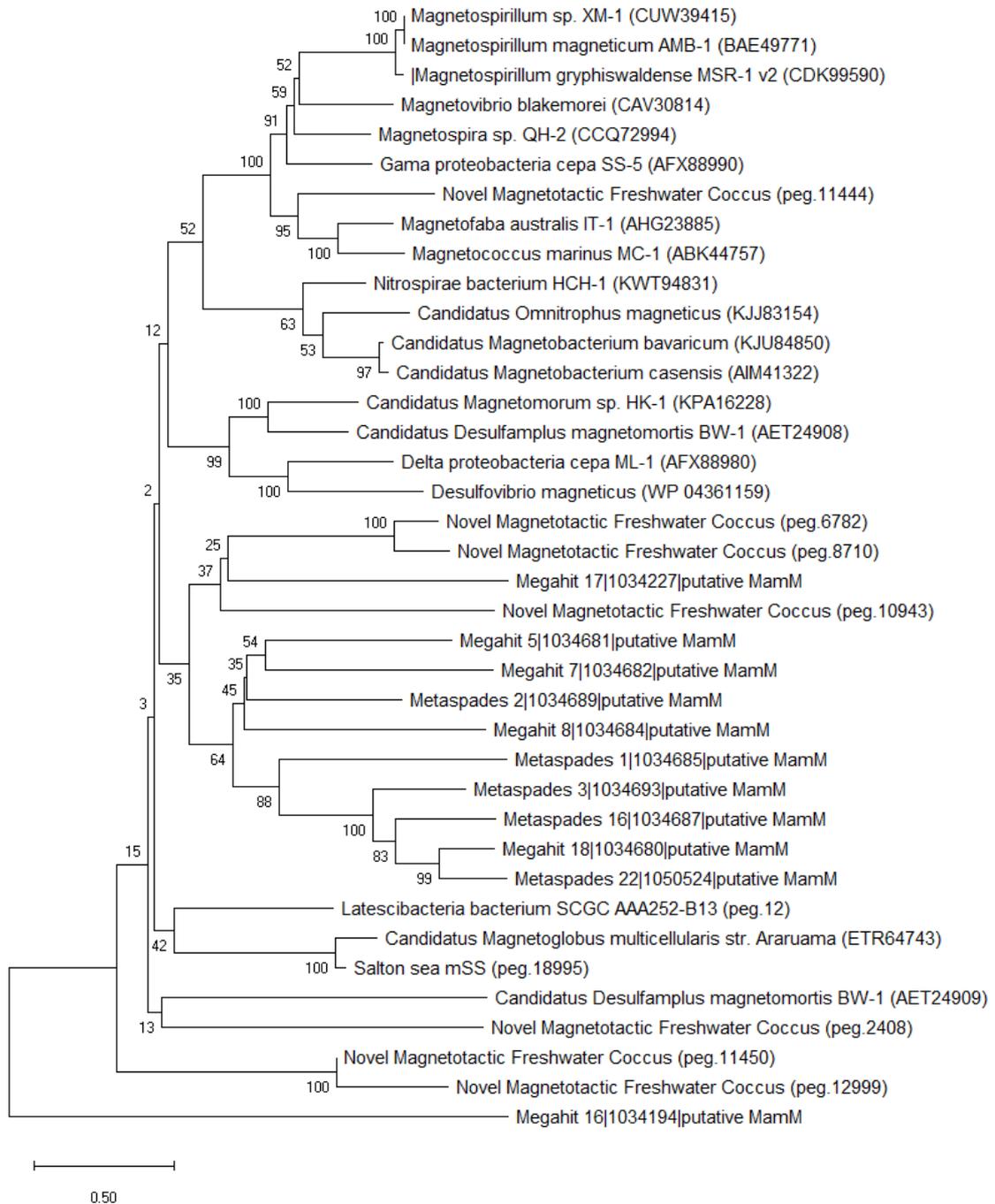


Figura 24. Árvore filogenética baseada em MamM. A análise filogenética foi feita pelo método de Neighbor-Joining. A barra de escala representa a distância evolutiva em substituições de aminoácido por sítio.

6. Discussão

6.1 Diversidade morfológica e cultivo de BMs

BMs nas amostras coletadas só foram observadas no ponto CF_1 de coleta. Considerando os fatores abióticos medidos nos locais de coleta, há sugestão que o OD possa influenciar a presença de BMs. No entanto, seria necessário estudo periódico e detalhado para ter certeza de tal afirmação. A presença de BMs na parte superior do sedimento é comum na descrição de BMs, sendo que em alguns trabalhos nos quais foi feita a medida do gradiente óxico-anóxico foi demonstrado que o microambiente se torna aneróbico em menos de 1 cm de profundidade (ABREU *et al.*, 2007; ABREU *et al.*, 2018).

Considerando o cultivo de BMs, a dificuldade no isolamento de novas espécies se dá principalmente devido ao desafio de se reproduzir os gradientes físico-químicos dos ambientes naturais. O avanço nas técnicas independentes de cultivo tem permitido aumentar o conhecimento sobre a diversidade destes microrganismos e inferir sobre alguns dos processos evolutivos de biomineralização. No entanto, o conhecimento sobre a importância ecológica associada à fisiologia desses microrganismos nos diferentes ambientes se torna difícil quando não se tem o microrganismo cultivado (MORILLO, 2014). A primeira BM cultivada em cultura axênica foi um espirilo produtor de magnetita chamado *Aquaspirillum* (agora *Magnetospirillum*) cepa *magnetotacticum* MS-1 (BLAKEMORE, 1975). A dificuldade de isolar e cultivar novas espécies de BMs dificultou por muito tempo as pesquisas com esses microrganismos, embora, ao longo dos últimos 30 anos, diversas espécies de BMs tenham sido isoladas em cultura axênica desde 2011 (LEFÈVRE, & BAZYLINSKI, 2013). Atualmente existem aproximadamente 44 espécies de BMs em cultivo axênico (TAVEIRA, 2021). Com o objetivo de acrescentarmos BMs à restrita lista de BMs isoladas e cultivadas em culturas puras, para o cultivo dos bacilos magnetotáticos do canal de Cabo Frio, foi utilizado o meio de cultura EMSH heterotrófico, semi-sólido, com adição de succinato de sódio, acetato de sódio, pH 8,0. Inicialmente, quando a amostra ambiental foi observada, era possível identificar uma grande diversidade de morfotipos. No entanto, um morfotipo minoritário na amostra de acordo com as observações por microscopia óptica foi o que cresceu no meio de cultura. Neste primeiro momento apenas bacilos magnetotáticos foram identificados no meio de cultura e não foram observadas contaminações ou coexistência de outros morfotipos magnetotáticos ou não magnetotáticos nos meios de cultura. Esse resultado indica que o meio de cultura tenha sido apropriado para o isolamento da BM em questão, uma vez que o crescimento foi abundante nas primeiras passagens da célula.

No entanto, houve o surgimento e posterior domínio da cultura por uma outra cepa, também em formato de bacilo, porém sem resposta magnetotática. As células dimensões da célula não magnetotática eram menores o que exclui a possibilidade de perda da capacidade magnetotática devido a perda dos genes de biomineralização, como descrito para espécies do gênero *Magnetospirillum* (ULLRICH *et al.*, 2005). Quando a contaminação foi detectada havia coexistência dos bacilos magnetotáticos e não magnetotáticos. Foram realizadas tentativas de remoção dos bacilos magnetotáticos através de “racetrack” do meio de cultura contendo as duas cepas, mas sem sucesso. O produto de “racetrack” era inoculado em meios novos, estéreis, preparados com reagentes novos e/ou estéreis para tentar minimizar ao máximo as chances de contaminação dos meios. Após 7 dias de incubação na estufa foi feita a primeira checagem dos meios. O declínio da população de bacilos magnetotáticos do Canal de Cabo Frio era evidente.

As bactérias são capazes de crescer e se dividir com tempos de gerações muito diferentes, dependendo da cepa bacteriana e da natureza do ambiente ecológico nicho. Algumas bactérias podem crescer rapidamente em comparação às outras (COX, 2003). A coexistência de várias forquilhas de replicação nestas bactérias permite que o tempo de geração seja menor que o tempo de replicação do DNA. As conhecidas bactérias modelo *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* normalmente pertencem a este conjunto de bactérias de crescimento rápido ou ultrarrápido (tempo de geração em mídia avançada a 37 °C é de aproximadamente 20 min) (BREMER & DENNIS, 1996; COX, 2003; SARGENT, 1975). Em contraste, algumas bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycoplasma* (*M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*) possuem tempos mais longos de geração (de 6 a 24 h). Mesmo em bactérias de crescimento rápido, a taxa de crescimento pode variar significativamente em resposta às condições ambientais ou à composição de meios de cultura ou condições de incubação. Os mecanismos que controlam a adaptação da taxa de crescimento ao meio têm sido extensivamente investigados durante os últimos 70 anos, em particular para *E. coli* e *B. subtilis*: (a) ao nível de população, através do estudo do comportamento das bactérias em taxas de crescimento baixas e altas; (b) ao nível dos componentes celulares, que a taxa de crescimento é dependente através da identificação de genes e proteínas e suas dinâmicas; (c) ao nível das redes reguladoras, através da identificação dos mecanismos de regulação envolvidos na gestão da taxa de crescimento. Vários modelos foram desenvolvidos durante os últimos 50 anos, integrando alguns recursos de gerenciamento de taxa de crescimento. Alguns métodos matemáticos também surgiram recentemente como ferramentas para prever a taxa de crescimento com base no meio ou no estado fisiológico da bactéria, através da previsão dos fluxos metabólicos. Apesar deste enorme progresso teórico e experimental, várias questões

permanecem em aberto, em particular uma apontada por Koch em (KOCH, 1997): “O que limita o crescimento?” Várias causas, como a capacidade de transporte das bactérias, o esgotamento de um nutriente, uma limitação física ou limitação bioquímica, foram propostas (KOCH, 1997).

Gargalos populacionais impõem uma redução rápida e muitas vezes drástica no tamanho da população. Tais eventos são comuns e inevitáveis durante a dinâmica evolutiva de populações naturais. Flutuações no tamanho da população ao longo do tempo desempenham um papel importante na ecologia e evolução dos organismos procarióticos (FRASER *et al.*, 2009). Fatores abióticos no ambiente podem levar a uma redução severa do tamanho da população. Exemplos são mudanças sazonais (por exemplo, flutuações de temperatura, luminosidade) ou limitação de recursos que podem resultar em apenas uma pequena fração de a população sobrevivendo a um evento seletivo temporário por exemplo, via persistência ou dormência (BALABAN *et al.*, 2004). Interações entre espécies (ou seja, fatores bióticos) também podem levar a flutuações no tamanho da população bacteriana ao longo do tempo. Por exemplo, o ciclo de vida de bactérias associadas ao hospedeiro é frequentemente caracterizado por repetidos eventos de gargalo populacional. Para bactérias patogênicas, a transmissão para um novo hospedeiro e a seleção pelo sistema imunológico do hospedeiro reduzem drasticamente o tamanho da população bacteriana em cada ciclo de infecção (DIDELOT *et al.*, 2016; MOXON & KUSSEL 2017). O ciclo de vida das bactérias em interações mutualísticas (ou seja, simbiose benéfica) também é caracterizado por sucessivos gargalos populacionais, que normalmente ocorrem no início estágios da colonização do hospedeiro devido a efeitos fundadores. O efeito de fortes gargalos populacionais é bem reconhecido em simbioses bacterianas herdadas verticalmente, onde apenas algumas células bacterianas são transferidas para a próxima geração (por exemplo, como em pulgões ou simbioses de besouros (FUNK *et al.*, 2001; McCUTCHEON & MORAN 2012; SALEM *et al.*, 2017).

A evolução da horizontalidade de simbioses transmitidos também pode ser caracterizada por fortes gargalos populacionais. Ao lado dos efeitos fundadores, a prioridade de colonização pode induzir fortes gargalos populacionais para os colonizadores que chegam sucessivamente, onde o primeiro colonizador restringe o habitat para os colonizadores que chegam mais tarde (STEPHENS *et al.*, 2015; WEIN *et al.*, 2018). Finalmente, a predação de fagos constitui um fator importante que leva a repetidos gargalos populacionais e, conseqüentemente, diminuição do tamanho das populações bacterianas (AVRANI *et al.*, 2011; KOSKELLA & BROCKHURST 2014). Notavelmente, os gargalos populacionais podem ser neutros devido à amostragem aleatória da população bacteriana - onde a probabilidade de sobreviver o gargalo depende do genótipo.

Os gargalos populacionais constituem um fenômeno comum da demografia da maioria dos organismos, mas são praticamente inevitáveis para doenças patogênicas causadas por bactérias devido à transmissão entre hospedeiros, bem como forte seleção de sistema imunológico e antibióticos. Gargalos populacionais podem afetar a adaptação de organismos de maneiras variadas, mas estas podem ser amplamente agrupadas em efeitos genéticos, que podem ser estocásticos ou determinísticos, e efeitos demográficos, que são geralmente determinísticos, pois os gargalos aumentam mortalidade. Por exemplo, gargalos reduzem a variação genética eliminando estocasticamente alelos raros de populações, e a consequência mais simples do gargalo é uma redução na taxa de adaptação ao ambiente (COLEGRAVE, 2002; DE VISSER & ROZEN, 2005).

Em algumas circunstâncias, se a intensidade do gargalo for maior que a taxa de crescimento populacional, o tamanho da população começar a declinar, o que acabará por resultar em extinção a menos que a seleção atue para aumentar a taxa de crescimento populacional. Nesse cenário, que costuma ser conhecido como resgate evolutivo, o destino das mutações benéficas depende de como elas alteram a aptidão absoluta dos organismos frente ao gargalo populacional (BELL, 2013; GOMULKIEWICZ & HOLT, 1995).

Neste trabalho foi observada mudança populacional em duas etapas diferentes, uma na amostra de água e sedimento coletada e outra na cultura de bastonete magnetotático. No primeiro caso, é muito provável que o armazenamento da amostra por longo período tenha resultado na limitação de recursos, que culminou com a queda da diversidade de BMs da amostra. Essa mudança na população de BMs é comum em amostras ambientais armazenadas por longos períodos no laboratório (dados não publicados). Seria interessante fazer um estudo sistemático das variações das concentrações de nutrientes essenciais ao crescimento microbiano, como nitrogênio e fósforo, e observar a mudança na população de BMs. Fatores como predação e competição também podem estar associados, no entanto, como estes são mais complexos, o estudo sobre a relevância dos nutrientes, principalmente adicionando a análise de ferro nas amostras, seria primordial para dar início a compreensão dessas mudanças populacionais. Quanto a mudança populacional na cultura obtida podemos sugerir que a(s) bactéria(s) contaminantes tenham maior taxa de crescimento ou que produzam algum fator que iniba o crescimento do bastonete magnetotático, competindo por nutrientes e causando sua morte em longo prazo.

6.2 Bastonete magnetotático cultivado e suas implicações em biotecnologia

Cristais minerais magnéticos que compõem os magnetossomos possuem características físicas e magnéticas únicas e propriedades que são importantes para seu uso em diversas aplicações. Esses cristais exibem uma morfologia de cristal consistente de acordo com a espécie de BM, como uma estreita faixa de tamanho, pureza química relativamente alta e poucos defeitos nos planos cristalinos (BAZYLINSKI, GARRATT-REED & FRANKEL, 1994; BAZYLINSKI *et al.*, 1995). A forma dos cristais de magnetita (Fe_3O_4) varia entre as espécies de BMs, mas, em geral, uma espécie de BM sintetiza cristais de uma morfologia específica (BALKWILL, MARATEA & BLAKEMORE, 1980; BAZYLINSKI *et al.*, 2004). Os cristais de magnetita e greigita (Fe_3S_4) dos magnetossomos geralmente exibem formato constante, embora leve variações de tamanho e forma às vezes são observadas para greigita (MOISESCU, ARDELEAN & BENNING, 2014). Segundo DEVOUARD *et al.*, (1998), o ambiente de crescimento não influencia na formação de cristais defeituosos. Sabe-se que alguns parâmetros ambientais influenciam a morfologia e a composição dos cristais nos magnetossomos; as taxas de absorção de ferro pela BM parecem alterar a morfologia dos cristais de magnetita (FAIVRE *et al.*, 2007) e as concentrações de elementos como cobalto (STANILAND *et al.*, 2008) e manganês (KEIM, LINS & FARINA 2009) nos meios de crescimento de algumas espécies de BMs parecem influenciar na inserção desses elementos na estrutura cristalina do cristal de magnetita sintetizado. No entanto, não parâmetros químicos ou físicos não influenciam ou regulam diretamente a formação de magnetossomos ou controlam a sua morfologia, uma vez que o processo de sua formação é controlado geneticamente. Os fatores ambientais podem ter um ligeiro controle sobre o tamanho e defeitos dos magnetossomos enquanto que os formatos cristalinos (cubo-octaédrico, alongado-prismático e alongado-anisotrópico) são claramente determinados pela genética (PÓSFAI *et al.*, 2013).

O bastonete magnetotático isolado neste trabalho apresentou magnetossomos com formato geral que pode ser classificado como prismático. A direção de alongamento do cristal [111] foi determinada usando HRTEM e FFT. PÓSFAI *et al.*, (2013) discutiram que o alongamento de magnetossomos em BMs é paralelo ao eixo do cristal [111] para as formas equidimensionais (magnetossomos cubo-octaédricos e octaédricos) e formas prismáticas alongadas. Assim, os magnetossomos de magnetita que apresentam essa característica podem ser considerados os mais evoluídos do ponto de vista evolutivo (PÓSFAI *et al.*, 2013). O eixo de alongamento, a forma e o tamanho de cada tipo de magnetossomo parecem estar relacionados à evolução das BMs e são considerados como uma assinatura da magnetita

biogênica (PÓSFAL *et al.*, 2013). Outra característica interessante dos magnetossomos dos bastonetes magnetotáticos é que, em muitos casos, foi observado um estrangulamento na parte central do magnetossomo, o que nos levou a descrevê-lo como uma ampulheta. Essa característica de forma pode indicar que o processo de biomineralização nessa célula não é tão bem controlado, uma vez que há essa variação na forma não observada em outras BMs. Além disso, outro dado que indica um processo com menos controle é o alto índice de magnetossomos com defeitos (UEBE & SCHÜLER, 2016). O processo de biomineralização com menor controle pode ser interessante do ponto de vista biotecnológico, uma vez que pode facilitar a incorporação de outros metais no magnetossomo ou permitir a manipulação do tamanho do magnetossomo para aplicação em abordagens de biorremediação ou naquelas que necessitem de cristais magnéticos com diferentes propriedades, respectivamente.

Nas últimas décadas, o interesse pela tecnologia em nanoescala (nanotecnologia) e biotecnologia tem aumentado significativamente devido ao desenvolvimento e estabelecimento de novos processos e aplicações comerciais, médicas e científicas que utilizam nanomateriais, alguns dos que são derivados biologicamente. Um excelente exemplo de nanomaterial biológico que está mostrando grande promessa para uso em um grande número de aplicações comerciais e médicas são magnetossomos de magnetita. Ao contrário das nanopartículas de magnetita sintetizadas quimicamente, o magnetossomo consiste de cristais de magnetita que apresentam domínios magnéticos únicos estáveis e, portanto, são permanentemente magnéticos na temperatura ambiente, são de alta pureza química e exibem uma faixa de tamanho estreita e cristais de morfologia consistente. Estas características físicas/químicas são importantes em seu uso em biotecnologia e outras aplicações (ABREU *et al.*, 2018).

É concebível, entretanto, que magnetossomos prismáticos alongados de BMs, como *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1^T, podem carregar maior quantidade de moléculas funcionais em sua superfície porque a relação de comprimento/largura destes cristais é maior do que a de cristais cuboctaédricos (ABREU *et al.*, 2013).

Os magnetossomos são relevantes na paleogeografia, representando um registro fóssil importante de ecossistemas, bem como na determinação da vida, funcionando como biomarcadores (KOPP & KIRSCHVINK, 2008).

A capacidade de produção de magnetossomos é de grande interesse nas áreas de biotecnologia, biomedicina e proteção ambiental. No entanto, a necessidade de métodos de cultivo mais eficientes para produção em massa de magnetossomos representa o maior obstáculo a potenciais aplicações. Para este efeito, várias abordagens foram desenvolvidas e testadas para tal cultivo de alto rendimento, incluindo otimização de concentração de oxigênio

dissolvido, nutrientes balanceados estratégias de alimentação e engenharia genética. Ainda continua a ser uma necessidade urgente desenvolver sistemas melhorados e otimização de condições para potencialização de rendimento de magnetossoma em escala de laboratório e escala de produção em massa (comercial ou industrial) (BASIT *et al.*, 2020). Um esforço considerável de pesquisa foi, portanto, concentrado na produção de magnetossomos de alta quantidade (MARCANO *et al.*, 2017; ALPHANDÉRY *et al.*, 2013). No entanto, seu cultivo em condições experimentais tem sido difícil por causa de sua alta precisão e condições de vida restritas dessas bactérias (POSTEC *et al.*, 2012). Isolamento, identificação e caracterização de magnetossomos são geralmente em uma fase inicial de pesquisa. O maior obstáculo para o cultivo em escala de produção (comercial ou industrial) é a necessidade de alto rendimento de magnetossomo em despesa razoável e custo de energia (SHIMOSHIGE *et al.*, 2015; ALI *et al.*, 2017). Em teoria, o rendimento do magnetossomo pode ser melhorado através da modificação (otimização) da composição do meio de cultura e condições de crescimento (ALI *et al.* 2017; LI *et al.*, 2010). No entanto, poucos estudos concentraram-se em tal otimização. Efeitos no crescimento de mudanças em fatores como temperatura, pH, concentração de oxigênio e concentrações de vários sais e ácidos têm sido repetidamente investigados, mas maior ênfase é necessária na maximização do rendimento dos magnetossomos (ALI *et al.*, 2017).

Apesar de o magnetossomo ser o primeiro produto de interesse em biotecnologia quando se trata de BMs, a capacidade de acúmulo de substâncias em grânulos também pode ser relevante, uma vez que seria fácil sua recuperação através da aplicação de campo magnético externo. Grânulos ou corpos de inclusão estão frequentemente presentes em organismos procarióticos (SHIVELY, 1974). Um dos mais comuns consiste em poli-hidroxi-alcanoato; outro armazenamento formado pelos procariotos é o glicogênio. Muitas bactérias são capazes de oxidar enxofre reduzido, e frequentemente o enxofre elementar se acumula dentro a célula em grandes grânulos. Uma variedade de microrganismos acumula grandes reservas de fosfato inorgânico como grânulos de polifosfato que são classificados como minerais amorfos (TAYLOR & SIMKISS, 1989) devido à falta de ordem cristalina.

BM's contêm grânulos de diferentes tipos e tamanhos (BALKWILL, MARATEA & BLAKEMORE, 1980; THORNHILL *et al.*, 1994), mas os grânulos não foram estudados detalhadamente. Neste trabalho, estudamos mostramos que o bastonete magnetotático cultivado possuía grânulos contendo fósforo e oxigênio como elementos principais. Esses grânulos são provavelmente de polifosfato e representam um compartimento diferente do magnetossomos e estavam nas extremidades da célula. Assim, a BM estudada neste trabalho poderia ser aplicada em processos que visam a remoção ou recuperação de fósforo de efluentes.

No entanto, é possível que a depender das características do efluente outros elementos sejam recuperados. A alta solubilidade dos grânulos amorfos permite que a bactéria incorpore íons estranhos (MASON & SIMKISS, 1982; SIMKISS, 1994). Já foi relatado que BMs podem incorporar íons de alumínio como sais precipitados ou associados a compostos orgânicos. Como a distribuição elementar de alumínio co-localiza com fósforo, é possível que o alumínio precipite na forma de sal em vez de associado com matéria orgânica. A capacidade dos grânulos de incorporar íons metálicos, como o alumínio, pode indicar um papel fisiológico de detoxificação (APPANA & HAMEL, 1996; GADD, 1990).

Abordagens usando BMs e suas habilidades metabólicas foram descritas para o desenvolvimento de novas tecnologias em biorremediação. Por exemplo, SHIMOSHIGE *et al.* (2017) isolou uma nova cepa de *Ms. magneticum* (cepa RSS-1) capaz de sintetizar magnetossomos de magnetita que têm um revestimento fino de óxido de samário (SHIMOSHIGE *et al.*, 2017). A co-precipitação de outro mineral na vesícula do magnetossomo sugere o uso potencial de BMs na recuperação magnética de metais de transição e síntese de estruturas compostas por partículas magnéticas e metais de transição. Já ZHOU *et al.* (2017) usaram a engenharia genética para melhorar o acúmulo de fosfato pelas células de *Ms. gryphiswaldense* no tratamento de águas residuais (ZHOU *et al.* 2017).

Dado o consumo crescente de fósforo globalmente, grandes quantidades dele estão sendo constantemente lançado em águas residuais, resultando em poluição ambiental grave, como a eutrofização. Estima-se que 15-20% da demanda mundial de rochas de fosfato poderia ser satisfeita pela recuperação de fósforo de fluxos de lixo doméstico (YUAN *et al.*, 2012). Devido a razões econômicas, métodos biológicos têm sido amplamente utilizados em sistemas de tratamento de águas residuais municipais. Organismos acumuladores de polifosfato (PAOs) podem acumular fosfato como polifosfato (polyP). No entanto, a co-existência organismos de acúmulo de glicose (GAOs) geralmente levam à deterioração geral do desempenho de remoção biológica de P, especialmente quando a temperatura é superior a 25 °C (ONG *et al.*, 2014). O isolamento de uma cultura pura dos principais organismos responsáveis por acumular fosfato ainda é um desafio (IRIE *et al.*, 2016). Assim, outros tipos de microorganismos, incluindo *Escherichia coli* geneticamente modificada, foram explorados para biorremediação ambiental in situ (DAS *et al.*, 2016; HIROTA *et al.*, 2010; URGUN *et al.*, 2006). Dado o aumento da acumulação de P graças às propriedades de bactérias geneticamente modificadas, considera-se utilizar outros microorganismos, também geneticamente modificados para melhorar suas habilidades de absorção de P. Em particular, BMs são promissoras para a biorremediação devido às suas propriedades magnéticas.

BMs têm sido exploradas para absorção de metais pesados e, em seguida, são fisicamente recuperadas do meio (TANAKA *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2012). Até então, BMs não foram pouco exploradas para remoção de P e recuperação de águas residuais. Algumas variedades de BMs sintetizam poliP (SCHULTHEISS *et al.*, 2005). No entanto, a eficiência do acúmulo de poliP em BMs do tipo selvagem é muito baixa para ser útil para aplicações de tratamento de águas residuais. No trabalho de Zhou *et al.*, 2017, *Magnetospirillum gryphiswaldense* foi geneticamente modificado para conter o gene *ppk* para remoção de P das águas residuais e foi subsequentemente recuperada através de um campo magnético aplicado. O trabalho concluiu que uma abordagem genética direta pode ser usada para BMs para melhorar suas habilidades de remoção de fosfato, tornando-as promissoras para remoção de P e biorremediação.

6.3 Metagenômica

Com base nos dados sobre a forma dos magnetossomos dos bastonetes magnetotáticos, era esperado que estes tivessem relação filogenética com proteobactérias, uma vez que PÓSFAI e colaboradores mostraram que magnetossomos prismáticos com crescimento no eixo [111] pertenceriam ao filo Proteobacteria (PÓSFAI *et al.*, 2013). No entanto, a análise taxônômica dos dados gerados no sequenciamento massivo a partir da cultura do bastonete magnetotático mostrou que a maior parte dos dados pertencia a bactérias afiliadas a Pseudomonadota, Bacteriodota e Mycoplasmodota, o que indica que o DNA dos bastonetes magnetotáticos pode não ter sido recuperado.

A classificação filogenética dos MAGs na plataforma RAST indica que talvez o MAG megahit 17 poderia ser uma Proteobacteria. No entanto, assim como nos outros MAGs não foi detectada a presença de genes marcadores filogenéticos, como o gene *rrs*, nos dados gerados pelo sequenciamento. Uma das possíveis explicações para isso é que essa região pode não ter sido sequenciada ou que apresentava baixa qualidade e, por isso, acabou sendo eliminada no tratamento dos dados.

Curiosamente, a mineração por genes de biomineralização conservados, indicou a presença de ORFs com homologia a estes genes em diversos MAGs. Porém, não foi observada a sintenia características destes genes em BMs, uma vez que nestas bactérias esses genes estão organizados em operons numa região do genoma (LIN *et al.*, 2017). A análise filogenética com base nas proteínas Mam mostram dados interessantes, uma vez que é descrito que esses genes são exclusivos de BMs e que sua evolução é consistente com a evolução do gene *rrs* (LEFÈVRE *et al.*, 2013). Assim, em situação como a análise evolutiva de MamA apresentada neste trabalho, a presença de ORFs das MAGs compartilhando

ancestrais comuns a BMs, indicaria que a ORF e a proteína MamA teriam história evolutiva em comum, sendo então o produto da ORF uma proteína exclusiva de BM. No entanto, em outros casos, como por exemplo, da análise evolutiva baseada em MamB, todas as ORFs identificadas com homologia a sequências de BM estão agrupadas como outgroup, o que indica que provavelmente não estão relacionadas ao processo de biomineralização.

Os dados genômicos obtidos são inconclusivos e será necessário realizar novo sequenciamento para elucidação da presença de genes de biomineralização e sua organização nos bastonetes magnetotáticos, o que ainda não foi realizado devido à necessidade de embarcação específica para coleta de testemunho por gravidade.

7. Conclusões

Os resultados apresentados neste estudo mostraram grande diversidade morfológica de BMs em ponto específico do Canal de Cabo Frio, RJ, Brasil. Através do cultivo em meio semissólido heterotrófico foi possível a obtenção de cultura mista contendo bastonetes magnetotáticos. O crescimento exarcebado de bactéria não magnetotática na cultura indica que será necessário estabelecer modificações no método de racetrack de forma a evitar a entrada dessa célula na extremidade capilar da pipeta Pasteur e sua consequente inoculação no meio de cultura. A análise dos magnetossomos mostrou que os bastonetes magnetotáticos possuem magnetossomos prismáticos que possivelmente possuem menor grau de controle durante a biomineralização, uma vez que foram observados com frequência cristais com formato de ampulheta. Essa característica não é descrita para as BMs cultivadas até o momento o que pode representar um potencial promissor para aplicação em nanotecnologias. Além disso, o presente trabalho é pioneiro, pois a bioprospecção de bactérias magnetotáticas no canal de Cabo Frio não havia sido feita anteriormente.

8. Referências

ABREU, F. **Bactérias magnetotáticas de ambientes extremos**. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia). Instituto de Microbiologia, Universidade Federal de Rio de Janeiro, 2010.

ABREU, F.; LEÃO, P.; VARGAS, G.; CYPRIANO, J.; FIGUEIREDO, V.; ENRICHPRAST, A.; BAZYLINSKI, D.A.; LINS, U. **Culture-independent characterization of a novel magnetotactic member affiliated to the Beta class of the Proteobacteria phylum from an acidic lagoon**. *Environ. Microbiol.* 20:2615- 2624, 2018.

ABREU, F.; SILVA, K.T.; LEÃO, P.; GUEDES, I.A.; KEIM, C.N.; FARINA, M.; LINS, U. **Cell adhesion, multicellular morphology, and magnetosome distribution in the multicellular magnetotactic prokaryote Candidatus Magnetoglobus multicellularis**. *Microsc. Microanal.* 19, 535–543, 2013.

ALI, I.; PENG, C.; KHAN, Z.M.; NAZ, I. **Yield cultivation of magnetotactic bacteria and magnetosomes: A review**. *Journal of Basic Microbiology*, 57(8): 643–652, 2017.

ALPHANDÉRY, E. **Applications of magnetosomes synthesized by magnetotactic bacteria in medicine**. *Bioengineering and Biotechnology*. 2, 5, 2014.

ALPHANDÉRY, E.; CHEBBI, I.; GUYOT, F.; DURAND-DUBIEF, M. **Use of bacterial magnetosomes in the magnetic hyperthermia treatment of tumours: A review**. *Int J Hyperth.* 29(8):801–9, 2013.

ALPHANDÉRY, E.; FAURE, S.; SEKSEK, O.; GUYOT, F.; CHEBBI, I. **Chains of Magnetosomes Extracted from AMB-1 Magnetotactic Bacteria for Application in Alternative Magnetic Field Cancer Therapy**. *ACS Nano*, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 6279–6296, 2011.

ALPHANDÉRY, E.; NGO, A.T.; LEFÈVRE, C.; LISIECKI, I.; WU, L.F.; PILENI, M.P. **Difference between the magnetic properties of the magnetotactic bacteria and those of the**

extracted chains of magnetosomes: influence of the distance between the chains of magnetosomes. J. Phys. Chem. C 112 12304-12309, 2008.

APPANA, V.L.; HAMEL, R. **Aluminum detoxification mechanism in *Pseudomonas fluorescens* is dependent on iron.** FEMS Microbiol. Lett. 143, 223-228, 1996.

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.

ARAUJO, A.; ABREU, F.; SILVA, K.; BAZYLINSKI, D.; LINS, U. **Magnetotactic Bacteria as Potential Sources of Bioproducts.** Mar. Drugs, 13:389-430, 2015.

AVRANI, S.; WURTZEL, O.; SHARON, I.; SOREK, R.; LINDELL, D. **Genomic island variability facilitates Prochlorococcus–virus coexistence.** Nature 474(7353):604–608, 2011.

AVRANI, S.; WURTZEL, O.; SHARON, I.; SOREK, R.; LINDELL, D. **Genomic island variability facilitates Prochlorococcus–virus coexistence.** Nature 474(7353):604–608, 2011.

BABES, L.; DENIZOT, B.; TANGUY, G.; LE JEUNE, J.J.; JALLET, P. **Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study.** J Colloid Interface Sci. Apr 15; 212 (2):474-482, 1999.

BALABAN, N.Q; MERRIN, J; CHAIT, R; KOWALIK, L; LEIBLER, S. **Bacterial persistence as a phenotypic switch.** Science 305(5690):1622–1625, 2004.

BALKWILL, D.L.; MARATEA, D.; BLAKEMORE, R.P. **Ultra-structure of a magnetotactic spirillum.** J. Bacteriol. 141, 1399–1408, 1980.

BARBER-ZUCKER, S.; ZARIVACH, R. **A Look into the Biochemistry of Magnetosome Biosynthesis in Magnetotactic Bacteria.** ACS Chemical Biology, [s. l.], p. acschembio.6b01000, 2016.

BARNES, S.M.; FUNDYGA, R.E.; JEFFRIES, M.W.; PACE, N.R. **Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment.** Proc Natl Acad

Sci USA 91: 1609–1613, 1994.

BASIT, A.; WANG, J.; GUO, F.; NIU, W.; JIANG, W. **Improved methods for mass production of magnetosomes and applications: a review.** *Microb Cell Fact* 19, 197, 2020.

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

BAZYLINSKI, D.; GARRATT-REED, A.; ABEDI, A.; FRANKEL, R. **Copper association with iron sulfide magnetosomes in a magnetotactic bacterium.** *Archives of Microbiology*, 160(1), 35-42, 1993.

BAZYLINSKI, D. A.; GARRATT-REED, A. J.; FRANKEL, R.B. **Electron Microscopic Studies of Magnetosomes in Magnetotactic Bacteria.** *Microsc. Res. Tech.* 27 389-401, 1994.

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 Fe₃O₄ in a magnetotactic bacterium.** *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3232–3239, 1995.

BAZYLINSKI, D. A.; FRANKEL, R. B. **Magnetosome formation in prokaryotes.** *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 217-230, 2004.

BAZYLINSKI, D. A.; SCHÜBBE, S. **Controlled Biomineralization by and Applications of Magnetotactic Bacteria.** *Advances in Applied Microbiology*, [s. l.], v. 62, n. 07, p. 21–62, 2007.

BAZYLINSKI, D. A.; LEFÈVRE, C.T.; SCHÜLER, D. **Magnetotactic Bacteria.** In *The Prokaryotes – Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. 4th ed.; Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 453-494, 2013.

BAZYLINSKI, D.A.; WILLIAMS, T.J.; LEFÈVRE, C.T.; BERG, R.J.; ZHANG, C.L.; BOWSER, S.S.; DEAN, A.J.; BEVERIDGE, T.J. **Magnetococcus marinus gen. nov.; sp.**

nov.; a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (Magnetococcaceae fam. nov.; Magnetococcales ord. nov.) at the base of the Alphaproteobacteria. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 63: 801-808, 2013.

BELL, G. **Evolutionary rescue and the limits of adaptation.** *Phil. Trans. R. Soc. B* 368, 20120080, 2013.

BLAKEMORE, R. **Magnetotactic bacteria.** *Science*, 190(4212), 377-379, 1975.

BLAKEMORE, R. P.; MARATEA, D. **Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically Isolation and Pure Culture of a Freshwater Magnetic Spirillum in Chemically Defined Medium.** *Journal of bacteriology*, [s. l.], v. 140, n. 2, p. 720–729, 1979.

BODE, G.; MAUCH, F.; DITSCHUNEIT, H.; MALFERTHEINER, P. **Identification of structures containing polyphosphate in Helicobacter pylori.** *J. Gen. Microbiol.* 139, 3029-3033, 1993.

BOSNES, M.; DEGGERDAL, A.; RIAN, A.; KORSNES, L.; LARSEN, F. **Magnetic Separation in Molecular Biology.** In: Häfeli U, Schütt W, Teller J, Zborowski M, editors. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers.* Boston: Springer US; pp. 269-85, 1997.

BREMER, H.; DENNIS, P.P. **Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate, in: F.C. Neidhart (Ed.), Escherichia Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, American Society of Microbiology Press, pp. 1553–1569, 1996.**

CAO, M.; LI, Z.; WANG, J.; GE, W.; YUE, T.; LI, R.; COLVIN, V.; YU, W. **Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis.** *Trends in Food Science & Technology.* 27. 47–56, 2012.

CHAUMEIL, P.A.; MUSSIG, A.J.; HUGENHOLTZ, P.; PARKS, D.H. **GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 38: 5315-5316, 2022.

COLEGRAVE, N. **Sex releases the speed limit on evolution.** Nature 420, 664– 666, 2002.

COLWELL, R.R. **The microbial species concept and biodiversity.** In: Biodiversity of Microorganisms and Its Relevance (D Hawksworth, D Allsopp and RR Colwell, eds), pp 3–15, CAB International, Wallingford, UK, 1994.

COLWELL, R.R.; HAWKSWORTH, D.L. International Union of Biological Sciences, International Union of Microbiological Societies Microbial Diversity 21, Action Statement. Physiological Newsl 27(3): 1: 8–9, 1991.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses,** Wiley-VCH, Weinheim, 2003.

CORREA, PRESCILIANO, R. ; ABREU, FERNANDA . **Why Does Not Nanotechnology Go Green? Bioprocess Simulation and Economics for Bacterial-Origin Magnetite Nanoparticles.** Frontiers in Microbiology, 12, p. 718232, 2021.

COX, B. L.; POPA, R.; BAZYLINSKI, D.A.; LANOIL, B.; DOUGLAS, S.; BELZ, A.; ENGLER, D.L.; NEALSON, K.H. **Organization and elemental analysis of P-, S-, and Fe-rich inclusions in a population of freshwater magnetococci.** Geomicrobiol J 19:387-406, 2002.

COX, R.A. **Correlation of the rate of protein synthesis and the third power of the RNA: protein ratio in *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis*.** Microbiology 149 (Pt 3) 729–737, 2003.

CYPRIANO, J., BAHRI, M.; DEMBELÉ, K.; BAAZIZ, W.; LEÃO, P.; BAZYLINSKI, D.A.; ABREU, F.; ERSEN, O.; FARINA, M.; WERCKMANN, J. **Insight on thermal stability of magnetite magnetosomes: implications for the fossil record and biotechnology.** Scientific reports, 10(1), 1-10, 2020.

CYPRIANO, J.; CASTRO, J. ; TAVEIRA, I. ; CORREA, TARCISIO ; AVALOS, D. A. ; ABREU, F. ; FARINA, MARCOS ; KEIM, C. N. . **Magnetosome Biomineralization by**

Magnetotactic Bacteria. In: Aydin Berenjian, Mostafa Seifan. (Org.). Mineral Formation by Microorganisms. 1ed. Hamilton, New Zealand: Springer Cham, 2022, v. 36, p. 243-281.

DAS, S.; HIRAK, R. D.; JAYA, C. **Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants.** Appl Microbiol Biotechnol 100:2967–2984, 2016.

DE VISSER, J.M.; ROZEN, D.E. **Limits to adaptation in asexual populations.** J. Evol. Biol. 18, 779 – 788, 2005.

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

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

DIDELOT, X.; WALKER, A.S.; PETO, T.E.; CROOK, D.W.; WILSON, D.J. **Within-host evolution of bacterial pathogens.** Nat Rev Microbiol. 14(3):150–162, 2016.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. **Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment.** Genome research 8: 175-185, 1998.

FAIVRE, D.; BÖTTGER, L.H.; MATZANKE, B.F.; SCHÜLER, D. **Intracellular magnetite biomineralization in bacteria proceeds by a distinct pathway involving membranebound ferritin and an iron(II) species.** Angew. Chem. Int., 46: 8495-8499, 2007.

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

FISCHER, A.; SCHMITZ, M.; AICHMAYER, B.; FRATZL P.; FAIVRE, D. **Structural purity of magnetite nanoparticles in magnetotactic bacteria.** Journal of The Royal Society Interface, 8(60), 1011-1018, 2011.

FLIES, C.B.; PEPLIES, J.; SCHÜLER, D. **Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments.** Appl Environ Microbiol. May;71(5):2723-31, 2005.

FRANKEL, R.B. **The discovery of magnetotactic/magnetosensitive bacteria.** Limnology, 27:1- 2, 2009.

FRANKEL, R.B.; DUNIN-BORKOWSKI, R.E.; PÓSFAL, M.; BAZYLINSKI, D.A. **Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria.** In E. Baeuerlein (Ed.), *Handbook of Biomineralization: The Biology of Biomineral Structure Formation* (Vol. 1). Springer, 2007.

FRASER, C.; ALM, E.J.; POLZ, M.F.; SPRATT, B.G.; HANAGE, W.P. **The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity.** Science 323(5915):741–746, 2009.

FUNK, D.J.; WERNEGREEN, J.J.; MORAN, N.A. **Intraspecific variation in symbiont genomes: bottlenecks and the aphid-buchnera association.** Genetics 157(2):477–489, 2001.

GADD, G.M. **Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms.** Experientia 46, 834-840, 1990.

GILBERT, J.A.; JANSSON, J.K.; KNIGHT, R. **The Earth Microbiome project: Successes and aspirations.** BMC Biology, v. 12, n. 1, p. 1–4, 2014.

GOMULKIEWICZ, R.; HOLT, R.D. **When does evolution by natural selection prevent extinction?** Evolution 49, 201 – 207, 1995.

HAWKSWORTH, D. L.; MOUND, L.A. **Biodiversity databases: the crucial significance of collections.** In: *The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role in Sustainable Agriculture* (DL Hawksworth, ed), pp 17–29, CAB International, Wallingford, UK, 1991.

HIROTA, R.; KURODA, A.; KATO, J.; OHTAKE, H. **Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses.** J Biosci Bioeng 109:423–432, 2010.

HONDA, T., TANAKA, T.; YOSHINO, T. **Stoichiometrically controlled immobilization of multiple enzymes on magnetic nanoparticles by the magnetosome display system for efficient cellulose hydrolysis.** *Biomacromolecules* 16, 3863-3868, 2015.

HYATT, D.; CHEN, G.L.; LOCASCIO, P.F.; LAND, M.L.; LARIMER, F.W.; HAUSER, L.J. **Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification.** *BMC bioinformatics* 11: 119, 2010.

IRIE, K.; FUJITANI, H.; TSUNEDA, S. **Physical enrichment of uncultured *accumulibacter* and *nitrospira* from activated sludge by unlabeled cell sorting technique.** *J Biosci Bioeng* 122:475–481, 2016.

JAIN, C.; RODRIGUEZ-R, L.M; PHILLIPPY, A.M; KONSTANTINIDIS, K.T; ALURU, S. **High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries.** *Nature communications* 9: 5114, 2018.

JOGLER, C.; NIEBLER, M.; LIN, W.; KUBE, M.; WANNER, G.; KOLINKO, S.; STIEF, P.; BECK, A. J.; BEER, D.; PETERSEN, N.; PAN, Y.; AMANN, R.; REINHARDT, R.; SCHÜLER, D. **Cultivation independent characterization of ‘*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*’ via ultrastructural, geochemical, ecological and metagenomic methods.** *Environ. Microbiol.*, 12: 2466-2478, 2010.

KANG, D.D.; LI, F.; KIRTON, E.; THOMAS, A.; EGAN, R.; AN, H.; WANG, Z. **MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies.** *PeerJ*. 2019.

KAWAGUCHI, R.; BURGESS, J. G.; MATSUNAGA T. **Phylogeny and 16S rRNA sequence of *Magnetospirillum* sp. AMB-1, an aerobic magnetic bacterium.** *Nucleic Acids Res.* 20:1140, 1992.

KEIM, C.; LINS, U.; FARINA, M. **Manganese in biogenic magnetite crystals from magnetotactic bacteria.** *FEMS Microbiol. Lett.*, 292: 250-253, 2009.

KJELDSTAD, B.; HELDAL, M.; NISSEN, H.; BERGAN, A.; EVJEN, K. **Changes in polyphosphate composition and localization in *Propionibacterium acnes* after near-ultraviolet irradiation.** J. Microbiol. 37, 562-567, 1991.

KOCH, A.L. **Microbial physiology and ecology of slow growth,** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61 (3) 305–318, 1997.

KOICHIRO, T.; GLEN, S.; SUDHIR, K. **MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11.** Molecular Biology and Evolution 38:3022-3027, 2021.

KOLINKO, S.; JOGLER, C.; KATZMANN, E.; WANNER, G.; PEPLIES, J.; SCHÜLER, D. **Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidatedivision OP3.** Env. Microbiol; 14:1709–1721, 2012.

KOLINKO, S.; RICHTER, M.; GLÖCKNER, F.O.; BRACHMANN, A.; SCHÜLER, D. **Single-cellgenomics reveals potential for magnetite and greigite biomineralization in an uncultivatedmulticellular magnetotactic prokaryote.** Environmental Microbiology Reports, 6(5), 524-531, 2014.

KOPP, R.E.; KIRSCHVINK, J.L. **The identification and biogeochemical interpretation of fossil magnetotactic bacteria.** Earth Sci. Rev. 86:42-61, 2008.

KOSKELLA, B.; BROCKHURST, M.A. **Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities.** FEMS Microbiol Rev. 38(5):916–931, 2014.

LEFÈVRE, C. T ; TRUBITSYN, D. ; ABREU, F. ; KOLINKO, S. ; ALMEIDA, L. G. P. ; VASCONCELOS, A. T. R. ; LINS, U. ; SCHULER, D. ; GINET, N. ; PIGNOL, D. ; Bazyliński, Dennis A . **Monophyletic Origin of Magnetotaxis and the First Magnetosomes.** Environmental Microbiology Reports, v. 15, p. 2267-2274, 2013.

LEFÈVRE, C. T; MENGUY, N.; ABREU, F.; LINS, U. ; POSFAI, M. ; PROZOROV, T. ; PIGNOL, D. ; FRANKEL, R. B. ; BAZYLINSKI, D. . **A Cultured Greigite-Producing Magnetotactic Bacterium in a Novel Group of Sulfate-Reducing Bacteria.** Science (New

York, N.Y.), v. 334, p. 1720-1723, 2011.

LEFÈVRE, C.; WU, L-F. **Evolution of the bacterial organelle responsible for magnetotaxis.** *Trend. Microbiol*, 210: 534-543, 2013 (a).

LEFÈVRE, C.T.; BAZYLINSKI, D.A. **Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 497–526, 2013 (b).

LEFÈVRE, C.T.; BERNADAC, A.; YU-ZHANG, K.; PRADEL, N.; WU, L-F. **Isolation and characterization of a magnetotactic bacterial culture from the Mediterranean Sea.** *Environ. Microbiol.*, 11: 1646-1657, 2009.

LEFÈVRE, C.T.; FRANKEL, R.; PÓSFAL, M.; PROZOROV, T.; BAZYLINSKI, D. **Isolation of obligately alkaliphilic magnetotactic bacteria from extremely alkaline environment.** *Environ. Microbiol.* 13: 2342-2350, 2011.

LI, J.; PAN, Y.; LIU, Q.; QIN, H.; DENG, C.; CHE, R.; YANG, X. **A comparative study of magnetic properties between whole cells and isolated magnetosomes of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1.** *Chinese Sci Bull.* 55(1):38–44, 2010.

LI, D.; LIU, C.M.; LUO, R.; SADAKANE, K.; LAM, T.W. **MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 31: 1674-1676, 2015.

LI, H. **Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 34: 3094-3100, 2018.

LIN, W.; LI, J.; SCHÜLER, D.; JOGLER, C.; PAN, Y. **Diversity analysis of magnetotactic bacteria in Lake Miyun, northern China, by restriction fragment length polymorphism.** *Syst Appl Microbiol*; 32: 342– 50, 2009.

LIN, W.; PAN, Y. **Temporal variation of magnetotactic bacterial communities in two freshwater sediment microcosms.** *FEMS Microbiol. Lett.* 302, 85-92, 2010.

LIN, W.; BENZERARA, K.; FAIVRE, D.; PAN, Y. **Intracellular biomineralization in bacteria.** *Front Microbiol* 2014b;5: 293, 2014.

LIN, W.; PAN, Y. **A putative greigite type magnetosome gene cluster from the candidate phylum Latescibacteria.** *Environ Microbiol Rep.* 2015; 7:237–42, 2015.

LIN, W.; PAN, Y.; BAZYLINSKI, D.A. **Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria.** *Environmental Microbiology Reports*, 9(4), 345-356, 2017.

LIN, W.; ZHANG, W.; ZHAO, X.; ROBERTS, A.; PATERSON, G.; BAZYLINSKI, D.; PAN, Y. **Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution.** *The ISME Journal*, 12(6), 1508-1519, 2018.

LINS, U.; FREITAS, F.; NEUMANN, C.K.; BARROS, H.L.; SQUIVEL, D.M.; FARINA, M. **Simple homemade apparatus for harvesting uncultured magnetotactic microorganisms.** *Braz. J. Microbiol.*, 34: 111-116, 2003.

LINS, U.; KEIM, C.; EVANS, F.; FARINA, M.; BUSECK, P.R. **Magnetite (Fe₃O₄) and greigite (Fe₃SO₄) crystals in multicellular magnetotactic prokaryotes.** *Geomicrobiology Journal*, 24(1), 43-50, 2007.

LIU, P.; TAMAXIA, A.; LIU, Y.; QIU, H.; PAN, J.; JIN, Z.; ZHAO, X.; ROBERTS, A.P.; PAN, Y.; LI, J. **Identification and characterization of magnetotactic Gammaproteobacteria from a salt evaporation pool, Bohai Bay, China.** *Environ Microbiol.* 24(2):938-950, 2022.

LLOYD, J.R.; BYRNE, J.M.; COKER, V.S. **Biotechnological synthesis of functional nanomaterials.** *Current opinion in biotechnology*, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 509–15, 2011.

LOCEY, K.J.; LENNON, J.T. **Scaling laws predict global microbial diversity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(21):5970-5, 2016.

LOHBE, A.; ULLRICH, S.; KATZMANN, E.; BORG, S.; WANNER, G.; RICHTER, M.; VOIGT, B.; SCHWEDER, T.; SCHÜLER, D. **Functional analysis of the magnetosome**

island in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: the mamAB operon is sufficient for magnetite biomineralization. Plos One, 6: e25561, 2011.

LOWER, H.; BAZYLINSKI, A. **The bacterial magnetosome: a unique prokaryotic organelle.** J Mol Microbiol Biotechnol, v. 23, p. 63-80, 2013.

MADIGAN, T.; MARTINKO, M.; DUNLAP, V.; CLARK, P. **Microbiologia de Brock.** 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 1160 p, 2010.

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.

MANNUCCI, S.; TAMBALO, S.; CONTI, G.; GHIN, L.; MILANESE, A.; CARBONCINO, A.; NICOLATO, E.; MARINOZZI, M.R.; BENATI, D.; BASSI, R.; MARZOLA, P.; SBARBATI, A. **Magnetosomes Extracted from *Magnetospirillum gryphiswaldense* as Theranostic Agents in an Experimental Model of Glioblastoma.** Contrast media & molecularimaging, 2018, 2198703, 2018.

MARCANO, L.; GARCÍA-PRIETO, A.; MUÑOZ, D.; BARQUÍN, L.F.; ORUE, I.; ALONSO, J.; MUELA, A.; FDEZ-GUBIEDA, M.L. **Influence of the bacterial growth phase on the magnetic properties of magnetosomes synthesized by *Magnetospirillum gryphiswaldense*.** Biochim Biophys Acta. 1861(6):1507–14, 2017.

MASON, A.; SIMKISS, K. **Sites of mineral deposition in metal-accumulating cells.** Exp. Cell Res. 139, 383-391, 1982.

McCUTCHEON, J.P.; MORAN, N.A. **Extreme genome reduction in symbiotic bacteria.** Nat Rev Microbiol. 10(1):13–26, 2012.

MOISESCU, C.; ARDELEAN, I.I.; BENNING, L.G. **The effect and role of environmental conditions on magnetosome synthesis.** Front. Microbiol. 5, 2014.

MORILLO, V.; ABREU, F.; ARAUJO, A.C.; ALMEIDA, L.G.P.D.; PRAST, A.E.; FARINA, M.; VASCONCELOS, A.; BAZYLINSKI, D.A.; LINS, U. **Isolation, cultivation and genomic**

analysis of magnetosome biomineralization genes of a new genus of South-seeking magnetotactic cocci within the Alphaproteobacteria. *Front. Microbiol.* 5: 72, 2014.

MOXON, R.; KUSSELL, E. **The impact of bottlenecks on microbial survival, adaptation, and phenotypic switching in host-pathogen interactions.** *Evolution* 71(12):2803–2816, 2017.

MURAT, D.; QUINLAN, A.; VALI, H.; KOMEILI, A. **Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(12), 5593-5598, 2010.

NIEMIROWICZ, K.; DURNAS, B.; TOKAJUK, G.; GLUSZEK, K.; WILCZEWSKA, A.Z.; MISZTALEWSKA, I.; MYSTKOWSKA, J.; MICHALAK, G.; SODO, A.; WATEK, M.; KIZIEWICZ, B.; GÓZDZ, S.; GLUSZEK, S.; BUCKI, R. **Magnetic nanoparticles as a drug delivery system that enhance fungicidal activity of polyene antibiotics.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 2395–2404, 2016.

NURK, S.; MELESHKO, D.; KOROBAYNIKOV, A.; PEVZNER, P.A. **metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler.** *Genome research* 27: 824-834, 2017.

OLM, M.R.; BROWN, C.T.; BROOKS, B.; BANFIELD, J.F. **dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication.**, *The ISME journal* 11: 2864-2868, 2017.

ONDOV, B.D.; TREANGEN, T.J.; MELSTED, P.; MALLONEE, A.B.; BERGMAN, N.H.; KOREN, S.; PHILLIPPY, A.M. **Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash.** *Genome biology* 17: 132, 2016.

ONG, Y.H.; CHUA, A.S.M.; FUKUSHIMA, T.; NGOH, G.C.; SHOJI, T.; MICHINAKA, A. **High-temperature EBPR process: the performance, analysis of PAOs and GAOs and the finescale population study of Candidatus “*Accumulibacter phosphatis*”.** *Water Res* 64:102–112, 2014.

PARKS, D. H.; IMELFORT, M.; SKENNERTON, C.T.; HUGENHHOLTZ, P.; TYSON,

G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research* 25: 1043-1055, 2015.

PARKS, D.H.; CHUVOCHINA, M.; RINKE, C.; MUSSIG, A.; CHAUMEIL, P.A.; PHILIP, H. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic acids research* 50: D785-D794, 2022.

PÓSFAL, M.; KASAMA, T.; DUNIN-BORKOWSKI, R.E. Biominerals at the nanoscale: transmission electron microscopy methods for studying the special properties of biominerals. *Miner. Nanoscale* 14:377-435, 2013.

PÓSFAL, M.; LEFÈVRE, C.T.; TRUBITSYN, D.; BAZYLINSKI, D.A.; FRANKEL, R.B. Phylogenetic significance of composition and crystal morphology of magnetosome minerals. *Front. Microbiol.* 4: 344. 2013.

POSTEC, A. I.; TAPIA, N.; BERNADAC, A.; JOSEPH, M.; DAVIDSON, S.; WU, L.F.; OLLIVIER, B.; PRADEL, N. Magnetotactic bacteria in microcosms originating from the French Mediterranean Coast subjected to oil industry activities. *Microb. Ecol.* 63, 1 1-11, 2012.

REDDY, L.; ARIAS, J.L.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical Reviews*, [s. l.], v. 112, n. 11, p. 5818–5878, 2012.

RICHTER, M.; KUBE, M.; BAZYLINSKI, D.; LOMBARDOT, T.; REINHARDT, R.; SCHULER, 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.

SALDANHA, C.; GARCIA, M.P.; IOCCA, D.C.; REBELO, L.G.; SOUZA, A.C.; BOCCA, A.L.; ALMEIDA, M.F, MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Nanosized Magnetite in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1–18, 2016.

SALEM, H.; BAUER, E.; KIRSCH, R.; BERASATEGUI, A.; CRIPPS, M.; WEISS, B.; KOGA, R.; FUKUMORI, K.; VOGEL, H.; FUKATSU, T.; KALTENPOTH, M. **Drastic genome reduction in an herbivore's pectinolytic symbiont.** *Cell* 171(7):1520–1531, 2017.

SARGENT, M.G. **Control of cell length,** *J. Bacteriol.* 123 (1) 7–19, 1975.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V.; LONGAIR, M.; PIETZSCH, T.; PREIBISCH, S.; RUEDEN, C.; SAALFELD, S.; SCHMID, B.; TINEVEZ, J.Y.; WHITE, D.J.; HARTENSTEIN, V.; ELICEIRI, K.; TOMANCAK, P.; CARDONA, A. **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.** *Nature Methods.* 9 (7): 676–682, 2012.

SCHÜLER, D.; BAEUELREIN, E. **Iron-limited growth and kinetic iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*.** *Arch. Microbiol.* 166, 301-307, 1996.

SCHÜLER, D.; SPRING, S.; BAZYLINSKI, D.A. **Improved technique for the isolation of magnetotactic spirilla from a freshwater sediment and their phylogenetic characterization.** *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 466-471, 1999.

SCHÜLER, D.; PEPLIES, J.; AMANN, R. **Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria,** Volume 3, 2007.

SCHULTHEISS, D.; SCHÜLER, D. **Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense*.** *Arch Microbiol* 179:89–94, 2003.

SCHWENGER, O.; JELONEK, L.; DIECKMANN, M.A.; BEYVERS, S.; BLOM, J.; GOESMANN, A. **Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification.** *Microbial genomics* 7, 2021.

SEELEY, H.W.; VANDEMAR, P.J.; LEE, J.J. **Microbes in action: a laboratory manual of microbiology,** Edited by W. H. Freeman and Co. 4. ed. New York, pp. 450, 1991.

SHIMOSHIGE, H.; NAKAJIMA, Y.; KOBAYASHI, H.; YANAGISAWA, K.; NAGAOKA,

Y.; SHIMAMURA, S.; MIZUKI, T.; INOUE, A.; MAEKAWA, T. **Formation of core-shell nanoparticles composed of magnetite and samarium oxide in *Magnetospirillum magneticum* strain RSS-1.** PLoS ONE, 12, e0170932, 2017.

SHIVELY, J. **Inclusion bodies in prokaryotes.** Annu. Rev. Microbiol. 28, 167-187, 1974.

SILVEIRA, F. “**Estudo Comparativo de Magnetossomos Prismáticos e Cuboctaédricos: Eficiência de Ligação à Moléculas e Viabilidade Econômica**”. dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação do Instituto de Microbiologia Paulode Góes, UFRJ, Rio de Janeiro, 2022.

SIMKISS, K. **Amorphous minerals in biology.** Bull. Institut Oceanogr. Monaco n. speècial 14, 49-54, 1994.

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; 9:2162–74, 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.

SPRING, S.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H.; VAN GEMERDEN, H.; PETERSEN, N. **Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment.** Appl Environ Microbiol; 59:2397–403, 1993.

STADELMANN, P. JEMS Java Electron Microscopy Simulation Software. Switzerland, <http://www.jems-saas.ch/2014>.

STANILAND, S.; WILLIAMS, W.; TELLING, N.; LAAN, G.; HARRISON, A.; WARD, B. **Controlled cobalt doping of magnetosomes in vivo.** Nat. Nanotechnol., 3: 158-162, 2008.

STEPHENS, W.Z.; WILES, T.J.; MARTINEZ, E.S.; JEMIELITA, M.; BURNS, A.R.; PARTHASARATHY, R.; BOHANNAN, B.J.; GUILLEMIN, K. **Identification of population**

bottlenecks and colonization factors during assembly of bacterial communities within the zebrafish intestine. mBio. 6(6):e01163-15, 2015.

SUN, J.B.; DUAN, J.H.; DAI, S.L.; REN, J.; GUO, L.; JIANG, W.; LI, Y. **Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin- loaded bacterial magnetosomes: Magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*.** Biotechnology and Bioengineering, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 1313–1320, 2008.

TANAKA, M.; WILLIAM, K.; ROSEMARY, B.; NICOLE, H.; ATSUSHI, A.; STEPHEN, B.; SARAH, S.; TADASHI, M. **Biomagnetic recovery and bioaccumulation of selenium granules in magnetotactic bacteria.** Appl Environ Microbiol 82:3886–3891, 2016.

TAOKA, A.; KIYOKAWA, A.; UESUGI, C.; KIKUCHI, Y.; OESTREICHER, Z.; MORII, K.; EGUCHI, Y.; FUKUMORI, Y. **Tethered magnets are the key to magnetotaxis: direct observations of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 show that MamK distributes magnetosomeorganelles equally to daughter cells.** MBio, 8(4), 2017.

TAVEIRA, I. **Dissertação de mestrado: Prospecção e diversidade de bactérias magnetotáticas na planície de inundação do rio Araguaia.** Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, CCS, UFRJ, 2021.

TAYLOR, M.G.; SIMKISS, K. **Structural and analytical studies on metal ion-containing granules. In: Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives.** Mann, S., Webb, J. and Williams, R.J.P., Eds., pp. 427-458, 1989.

THORNHILL, R.H.; BURGESS, J.G.; SAKAGUCHI, T.; MATSUNAGA, T. **A morphological classification of bacteria containing bullet-shaped magnetic particles.** FEMS Microbiol. Lett. 115, 169-176, 1994.

UEBE, R.; SCHÜLER, D. **Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria.** Nature Reviews Microbiology, 14 (10), 621-637, 2016.

ULLRICH, 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. Nov;187 (21):7176-84. 2005.

URGUN, D.; MELTEM, B.S.; KRISHNA, P. **Use of genetically engineered microorganisms (Gems) for the bioremediation of contaminants.** Crit Rev Biotechnol 26:145–164, 2006.

VARGAS, G.; CYPRIANO, J.; CORREA, T.; LEÃO, P.; BAZYLINSKI, D.A.; ABREU, F. **Applications of magnetotactic bacteria, magnetosomes and magnetosome crystals in biotechnology and nanotechnology: mini-review.** Molecules, 23(10), 2438, 2018.

WALLYN, J.; ANTON, N.; VANDAMME, T.F. **Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications- AReview.** Pharmaceutics (11),601, 2019.

WEIN, T.; DAGAN, T.; FRAUNE, S.; BOSCH, T.G.; REUSCH, T.H.; HÜLTER, N.F. **Carrying capacity and colonization dynamics of Curvibacter in the Hydra host habitat.** Front Microbiol. 9: 443, 2018.

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.** Environmental microbiology, 11(6), 1493-1505, 2009.

WERCKMANN, J.; CYPRIANO, J.; LEFÈVRE, C.T.; DEMBELÉ, K.; ERSEN, O.; BAZYLINSKI, D.A.; LINS, U.; FARINA, M. **Localized iron accumulation precedes nucleation and growth of magnetite crystals in magnetotactic bacteria.** Scientific Reports, 7(1), 1-10, 2017.

WILLIAMS, T.J.; LEFÈVRE, C.T.; ZHAO, W.; BEVERIDGE, T.J.; BAZYLINSKI, D.A. **Magnetospira thiophila gen. nov., sp. nov., a marine magnetotactic bacterium that represents a novel lineage within the Rhodospirillaceae (Alphaproteobacteria).** Int J Syst Evol Microbiol. 62 (Pt 10):2443-2450, 2012.

WOESE, C.R. **Microbiology in transition.** Proc Natl Acad Sci USA 91: 1601– 1603, 1994.

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

XIE, J.; CHEN, K.; CHEN, X. **Production, modification and bio-applications of magnetic nanoparticles gestated by magnetotactic bacteria.** Nano Res. 2: 261-278, 2009.

XU, J.; HU, J.; LIU, L.; LI, L.; WANG X.; ZHANG, H.; JIANG, W.; TIAN, J.; LI, Y.; Li J. **Surface expression of protein A on magnetosomes and capture of pathogenic bacteria by magnetosome/antibody complexes.** Frontiers in microbiology, 5, 136, 2014.

YAN, L.; ZHANG, S.; CHEN, P.; LIU, H.; YIN, H.; LIU, T. **Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application.** Microbiological Research. 167, 507- 519, 2012.

YOSHINO, T.; HIRABE, H.; TAKAHASHI, M.; KUHARA, M.; TAKEYAMA, H.; MATSUNAGA, T. **Magnetic cell separation using nano-sized bacterial magnetic particles with reconstructed magnetosome membrane.** Biotechnology and bioengineering, 101(3), 470-477, 2008.

YUAN, Z.; PRATT, S.; BATSTONE, D. J. **Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes.** Curr Opin Biotech 23:878–883, 2012.

ZHANG, W.Y.; ZHOU, K.; PAN, H.M.; YUE, H.D.; JIANG, M.; XIAO, T.; WU, L.F. **Two genera of magnetococci with bean-like morphology from intertidal sediments of the Yellow Sea, China.** Appl Environ Microbiol; 78:5606–11, 2012.

ZHOU W.; ZHANG, Y.; DING, X.; LIU, Y.; SHEN, F.; ZHANG, X.; DENG, S.; XIAO, H.; YANG, G.; PENG, H. **Magnetotactic bacteria: promising biosorbents for heavy metals.** Appl Microbiol Biotechnol 95:1097–1104, 2012.

ZHOU, Y.; LISOWSKI, W.; ZHOU, Y.; JERN, N.W.; HUANG, K.; FONG, E. **Genetic improvement of *Magnetospirillum gryphiswaldense* for enhanced biological removal of phosphate.** Biotechnol. Lett. 39, 1509–1514, 2017.

ZHU, K.; PAN, H.; LI, J.; YU-ZHANG, K.; ZHANG, S.-D. ZHANG, W-Y.; ZHOU, K.; YUE,

H.; PAN, Y.; XIAO, T.; WU, L.F. **Isolation and characterization of a marine magnetotactic spirillum axenic culture QH-2 from an intertidal zone of the China Sea.** Res Microbiol. 161(4):276-83, 2010.