

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

Dissertação de mestrado



Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia Vegetal e
Bioprocessos

Rogério Presciliano de Souza Filho

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
ORIGEM BIOLÓGICA PELA BACTÉRIA MAGNETOTÁTICA *MAGNETOFABA*
AUSTRALIS CEPA IT-1

RIO DE JANEIRO

2023

Rogério Presciliano de Souza Filho

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
ORIGEM BIOLÓGICA PELA BACTÉRIA MAGNETOTÁTICA *MAGNETOFABA*
AUSTRALIS CEPA IT-1

Dissertação de mestrado submetido 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 Ávila Abreu

Rio de Janeiro

2023

CIP - Catalogação na Publicação

P928o Presciliano de Souza Filho, Rogerio
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS DE ORIGEM BIOLÓGICA PELA BACTÉRIA
MAGNETOTÁTICA MAGNETOFABA AUSTRALIS CEPA IT-1 /
Rogerio Presciliano de Souza Filho. -- Rio de
Janeiro, 2023.
51 f.

Orientadora: Fernanda de Ávila 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. Bioprocessos. 2. Bactéria magnetotática. I.
de Ávila Abreu, Fernanda, orient. II. Título.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Fernanda de Ávila Abreu e que possibilitou o desenvolvimento do presente projeto, pelos inúmeros ensinamentos, pela confiança na minha capacidade e pelas experiências e oportunidades durante os dois anos de mestrado.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Celular, pelos aprendizados e discussões que contribuíram para a construção desse e outros trabalhos, além das amizades construídas no processo.

A minha família, que sustentou toda minha estrutura pessoal, que sempre investiu da minha educação e moldou a pessoa que sou hoje.

A meus amigos de longa data e as diversas amizades que construí durante o período da graduação, que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

A Unidade de Microscopia Multiusuário Padrón-Lins, pela estrutura e conhecimento técnico que possibilitou toda as microscopias do trabalho.

As agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq pelo suporte financeiro.

“A vida não é o que se viveu, mas sim o que se lembra, e como se lembra de contar isso.”

Gabriel Garcia Marquez

Resumo

A nanotecnologia compreende um conjunto de técnicas e ferramentas para a manipulação e estudo da matéria até sua organização atômica, sendo uma das principais tecnologias habilitadoras para as tendências de inovações em diversas áreas da indústria biomédica, de computação e ciências de materiais. Especificamente, as nanopartículas magnéticas, tem seu potencial provado para diversas aplicações. No entanto, para o sucesso dessas aplicações, é desejável que a produção em larga escala de nanopartículas magnéticas seja sustentável e economicamente viável. As bactérias magnetotáticas (MTB), são um grupo de procariotos que produzem nanopartículas magnéticas de origem biológica (NMOBs) a partir de um processo sustentável de biomineralização geneticamente controlado que garante pureza, uniformidade entre partículas, controle sobre tamanho e morfologia do cristal. Além disso, NMOBS são naturalmente revestidos por uma membrana lipídica, vantajosa para diversas aplicações pois facilita a ligação de moléculas funcionais a superfície, garante a estabilidade da magnetita e contribui para a segurança de aplicações *in vivo*. Devido a suas características, não só foram alvo de diversos estudos biotecnológicos, como também a otimização da produção em escala de NMOBs vem sendo cada vez mais investigada. No mesmo contexto, as próprias células de MTB são investigadas para diversas aplicações, não só devido ao seu comportamento magnetotático, mas também pela capacidade de acumular diversos metais e outros elementos do meio. Porém, a diversidade de MTB é pouco explorada em estudos biotecnológicos, *Magnetofaba australis* cepa IT-1, produtora de cristais de morfologia octaedro truncado, ainda não investigadas para aplicações biotecnológicas, compõem um gênero de MTB ainda não estudado com viés biotecnológico. O objetivo do trabalho, é avaliar como a composição do meio de cultivo da *Mf. australis* cepa IT-1 pode afetar o potencial biotecnológico da célula para produção de NMOBs e na formação de grânulos. Foi feita uma avaliação *in silico* das fontes de carbono e componentes traço a partir de um modelo metabólico baseado no genoma. Na bancada, foi avaliado qualitativamente o efeito de diferentes fontes de carbono e dos componentes traço sobre o crescimento celular, produção de NMOBs e acúmulo de fosfato. Em seguida, foi avaliado o efeito da variação de cada componente do meio de cultivo sobre o crescimento celular de *Mf. australis* cepa IT-1. A partir dos experimentos realizados foi definido que a formulação padrão do meio obteve a maior velocidade e crescimento celular, quando comparado as tentativas de reduzir o meio a uma fonte única de carbono, nenhuma das condições teve efeito

significativo na formação de grânulos. A partir das variações de concentrações, a razão C/N, o quinato férrico e a cisteína foram definidos como principais contribuintes para o crescimento celular.

Palavras-chave: Bioprocessos, nanopartículas magnéticas, bactérias magnetotáticas e biotecnologia

Abstract

Nanotechnology covers a set of techniques and tools for the manipulation and study of matter down to its atomic organization, being one of the main innovation enablers for current tendencies in industries such as biomedical, computer sciences, and material sciences. Magnetic nanoparticles, in particular, magnetite particles, have great potential as drug carriers, in magnetic hyperthermia, and pathogen detection among others. However, for the success of those applications, it is desirable that the production of nanoparticles is economically viable, scalable and control over size, shape and chemical purity is possible. Chemical synthesis of magnetite, by co-precipitation or hydrothermal synthesis, has limited reproducibility in terms of particle shape and size control, in addition to generating hazardous effluents. Magnetotactic bacteria (MTB), are a group of prokaryotes that produce magnetic nanoparticles surrounded by a biological membrane. In general, those particles are found in the cell's cytoplasm aligned in one or more chains, which makes possible their magnetic field-guided flagellar swimming. As an alternative to the chemical pathways of magnetite nanoparticles synthesis, magnetosomes (BM) are a product of a sustainable and genetically encoded biomineralization process that ensures control of particle size, shape and purity. In addition, the natural membrane around the particles is advantageous for several applications, since it contributes to chemical and colloidal stability and for the safety of *in vivo* applications. Due to its characteristics, BM are the focus of several biotechnological studies, where optimization of large-scale production is increasingly being investigated. In the field of bioprocesses, the great majority of studies focus on MTB from the genus *Magnetospirillum*, that produce cuboctahedral BM. Yet, other MTBs produce crystals of distinct morphologies, size and surface chemistry not yet explored for biotechnological applications. *Magnetofaba australis* strain IT-1, which produces crystals of truncated octahedral morphology, was neither investigated for biotechnological approaches, nor it was for bioprocesses. The goal of this study was to optimize the composition of the culture conditions of *Mf. australis* strain IT-1 for higher BM yields. Initially, an *in-silico* evaluation of carbon sources and trace components was done based on a genome-based metabolic model. A qualitative analysis of the carbon sources and trace components on cell growth and BM production tested experimentally. Then, the effect of the variation in concentration of each component of the culture media on cell growth was evaluated. From the experiments performed, the standard medium had higher growth speed and reached higher cell numbers. From the concentration variation

experiments, de C/N ration, ferric quinate and cysteine were the main contributors to cell growth.

Keywords: Bioprocesses, Magnetic nanoparticles, Magnetotactic bacteria and Biotechnology

Lista de abreviações

DOX: Doxorubicina

MTB: Bactéria magnetotática

NMOBs: Nanopartículas magnéticas de origem biológica

PHA: Polihidroxialcanoato

PHB: Polihidroxi butirato

Lista de tabelas

Tabela 1 Composição da solução de componentes auxotróficos	20
Tabela 2. Composição do meio líquido de cultivo de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.....	21
Tabela 3. Variáveis selecionadas com seus respectivos níveis a serem avaliados.	23
Tabela 4. Discriminação dos custos por litro dos componentes do meio líquido de cultura de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.	32
Tabela 5. Matriz de 8 experimentos para avaliação do efeito de 7 componentes do meio de cultivo, elas sendo razão Carbono/nitrogênio (X1), solução de minerais (X2), cisteína 3% (X3), Quinato férrico (X4), solução de vitaminas (X5), Tioossulfato de sódio (X6) e fosfato dipotássico (X7).	33

Lista de figuras

Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (a - f) e microscopia eletrônica de varredura (g - i) mostrando a diversidade morfológica de MTB. Setas pretas indicam a cadeia de magnetossomos. Barras de escala: a, b = 0.5 μm , c-i = 1 μm . Figura Goswami et al. (2022).	3
Figura 2. Representação da abrangência de MTB através dos filios do domínio Bactéria. Figura de Goswami et al. (2022).	4
Figura 3. As três principais etapas do processo de síntese do magnetossomo: (1) formação da vesícula a partir da invaginação da membrana interna e o recrutamento de proteínas; (2) nucleação do cristal; (3) maturação do cristal. ME: Membrana externa; MI = Membrana interna; MM = Membrana do magnetossomo. Imagem modificada de Correa et al. (2020).	6
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de NMOBs extraídos de <i>Mv. blakemorei</i> cepa MV-1 ^T puros (A) e funcionalizados com anfotericina b (B), setas pretas indicam a membrana da NMOB. Imagem adaptada de Correa et al. (2021).	8
Figura 5. Esquema representativo de NMOB de <i>Ms. gryphiswaldense</i> cepa MSR-1 expressando glicose oxidase (GOx), glucoronidase (GusA), o fluoróforo EGFP (mEGFP) e o anticorpo de domínio único para mCherry (RBP) fusionadas respectivamente as proteínas de membrana MamG, ManF, ManA e MamC. Figura retirada de Mickoleit, Lanzloth e Schüler (2020).	9
Figura 6. Análise filogenética baseado nos genes rRNA 16S da <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 compondo um novo gênero dentro de Alphaprotobacteria (Morillo et al., 2014).	12
Figura 7. Análise de balanço de fluxo para o modelo metabólico de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 em diferentes condições de cultivo para diferentes funções objetivas, produção de biomassa e atividade da ATPase.	24
Figura 8. Regressão linear entre o número de células e a densidade ótica da suspensão de células de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 ($P < 0,05$).	26
Figura 9. Curva de crescimento da <i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1 crescendo no meio padrão, com diferentes fontes únicas de carbono (acetato ou succinato) e no meio padrão com adição de extrato de levedura. Diferença estatística feita a partir de comparação múltipla de tukey com significância para $P < 0,05$	27
Figura 10. Efeito da remoção de vitamina e de ferro e da adição de extrato de levedura e dos componentes auxotróficos no número de células de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 após 48 horas de crescimento comparado ao meio padrão. Diferenças estatísticas avaliadas pelo teste de Tukey com alfa de 0,05.	28
Figura 11. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 crescendo no meio padrão (A), em meios com fontes únicas de carbono sendo ela, Acetato (B) e Succinato (C) e meio padrão com a adição de extrato de levedura (D)	29

Figura 12. Avaliação do número de NMOBs por célula de <i>Mf. Australis</i> cepa IT-1 crescendo no meio padrão (n = 31), em meios com fontes únicas de carbono sendo ela, Acetato (n = 16) e Succinato (n = 36) e meio padrão com a adição de extrato de levedura (n = 35). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t não pareado com significância para $P < 0,05$	30
Figura 13. Rendimento médio e desvio padrão da produção de NMOBs e massa de magnetita produzida para <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 após 48 horas de crescimento crescendo em meio padrão, com Succinato ou acetato como diferentes fontes únicas de carbono e em meio padrão com a adição de extrato de levedura. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t não pareado com significância para $P < 0,05$	31
Figura 14. Média de área por célula composta por grânulos em <i>Mf. australis</i> cepa IT-1, mensurado a partir de imagens de MET, avaliado em meio utilizando succinato (n = 20) ou acetato (n = 24) como fonte única de carbono no meio padrão (n = 15) e no meio padrão com adição de extrato de levedura (n = 16).	32
Figura 15. Número de células de <i>Mf. australis</i> após 48h de crescimento nos 8 meios estabelecidos a partir da variância dos componentes do meio padrão.	34
Figura 16. Gráfico de Pareto da contribuição de cada componente para o crescimento celular de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1. As barras em laranja indicam os componentes responsáveis por cerca de 80% do efeito.	35

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Nanopartículas magnéticas	1
1.2. Bactérias magnetotáticas	2
1.2.1. Bactérias magnetotáticas na biotecnologia	6
1.3. A <i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1	11
1.4. Otimização de bioprocessos	13
2. Justificativa.....	15
3. Objetivo.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. Metodologia	16
4.1. Cultivo de células de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.....	16
4.2. Quantificação de células de <i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1	16
4.2.1. Contagem direta por microscopia óptica de fluorescência.....	17
4.2.2. Regressão linear -	17
4.2.3. Contagem por citometria de fluxo	17
4.4. Microscopia eletrônica de transmissão	19
4.4.1. Análise das imagens de MET	19
4.4.2. Rendimento de NMOBs	19
4.4.3. Exclusão e substituição de fontes de carbono	19
4.8. Avaliação de vias metabólicas	22
4.9. Avaliação do efeito da variação das concentrações dos componentes do meio cultivo.....	22
5. Resultados	23
5.1. Modelagem metabólica e análise de balanço de fluxo	23
5.2. Crescimento celular em diferentes condições	25

5.2.1.	Adição e remoção de ferro e componentes traço.....	27
5.3.	Produção de NMOBs em diferentes condições	28
5.4.	Rendimento	30
5.5.	Produção de grânulos.....	31
5.6.	Custo do meio.....	32
5.7.	Efeito da variação das concentrações	33
6.	Discussão	35
6.1.	Cultivo de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e construção das curvas de crescimento	35
6.2.	Efeito da troca de fontes de carbono e de componentes traço.....	36
6.2.1.	Crescimento celular.....	36
6.2.2.	Rendimento de NMOBs	38
6.2.3.	Produção de grânulos.....	38
6.3.	Efeito da variação da concentração dos componentes sobre o crescimento celular	39
7.	Conclusão.....	41
8.	Produção científica e tecnológica.....	42
9.	Referências.....	43
10.	Anexos	50

1. Introdução

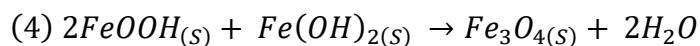
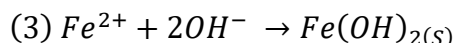
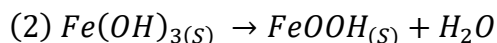
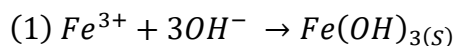
1.1. Nanopartículas magnéticas

A nanotecnologia é o entendimento e manipulação da matéria em dimensões entre 1 e 100 nm, sendo uma das principais habilitadoras de inovação em diversas áreas como na biomedicina, computação, ciências de materiais e eletrônica (Satalkar, Elger e Shaw, 2016). Dentre a vastidão de tópicos compreendidos por ela, o emprego de nanopartículas tem recebido atenção especial. Devido a imensa área de superfície disponível em uma suspensão de nanopartículas, elas correspondem a uma das formas mais eficientes da utilização da matéria (Satalkar, Elger e Shaw, 2016).

Ademais, abrem espaço para processos mais controlados, através do desenvolvimento de nanopartículas responsivas a estímulos, tanto externos (luz, ultrassom, campo magnético) ou particulares ao microambiente de ação (mudança no pH, presença de fatores de virulência, etc.) (Hamarat Şanlıer *et al.*, 2019; Makhathini *et al.*, 2020; Pornpattananangkul *et al.*, 2011; Stuart *et al.*, 2010). Especificamente as nanopartículas magnéticas, capazes de responder a campos magnéticos externos, são exploradas para diversas aplicações, como para carreamento de fármacos, contraste em ressonância magnética e para o tratamento de efluentes (Hasany *et al.*, 2013).

As nanopartículas magnéticas mais utilizadas, como as de óxido de ferro (magnetita, maghemita ou hematita), ainda que eficientes, dependem da viabilidade das vias de síntese em larga escala para serem aplicadas na indústria (Ali *et al.*, 2021a). Nesse quadro, as vias de síntese de químicas, físicas ou biológicas de nanopartículas de óxido de ferro devem ser avaliadas quanto ao controle sobre o tamanho, estrutura cristalográfica e pureza, além da análise de custos e ciclo de vida do processo. As vias químicas mais utilizadas são a co-precipitação e a síntese hidrotérmica (Ali *et al.*, 2021a).

A co-precipitação para a formação de nanopartículas de magnetita se baseia na reação entre íons $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ na proporção de 2/1 em meio aquoso com pH de 8 a 14, sob atmosfera inerte e em temperatura ambiente, o processo pode ser descrito de acordo com o sistema de equações (1, 2, 3 e 4) (Fatimah, Fadillah e Yudha, 2021). Devido ao seu baixo custo, metodologia reprodutível e baixo impacto ambiental é a via de síntese mais utilizada em escala laboratorial. No entanto, o controle sobre o tamanho e a cristalinidade das partículas é limitado (Ahn *et al.*, 2012).



Equação 1, 2, 3 e 4. Sistema de reações para a produção de magnetita pelo método de co-precipitação.

A síntese hidrotérmica depende da capacidade da água de hidrolisar e desidratar sais metálicos sob temperaturas acima de 200°C e pressão acima de 2000 psi em meio aquoso, condições que vão favorecer a precipitação do óxido de ferro (Hasany *et al.*, 2013). Nesse método, a concentração do sal e o tempo de reação tem uma correlação positiva com o tamanho e afetam a morfologia da nanopartícula (Hayashi e Hakuta, 2010). Maior controle sobre o tamanho e forma das nanopartículas podem ser obtidos com a adição de surfactantes orgânicos, como ácido oleico e ácidos graxos, que desaceleram o crescimento das partículas e contribuem para a formação de partículas esféricas (Effenberger *et al.*, 2017a). Atualmente é uma das vias com maior potencial para produção em larga escala. No entanto, o processo possui solventes tóxicos como efluente, além de utilizar alta temperatura e pressão (Faraji, Yamini e Rezaee, 2010).

A otimização da produção dessas partículas, em termos de rendimento e qualidade do produto, são tópicos recorrentes de pesquisa (Ali *et al.*, 2021b; Effenberger *et al.*, 2017b). Por exemplo, a correlação entre parâmetros do processo, como temperatura e tempo de reação, e as características das nanopartículas obtidas pelo método de microemulsão, foi avaliado por Sajid *et al.* (2023). Além disso, Jiang *et al.* (2023) visou ajustar parâmetros operacionais para um processo mais preciso de síntese por microfluídica. Fora do campo das sínteses químicas e físicas, a síntese biológica de nanopartículas de óxido de ferro encontra suas vantagens e desafios próprios, nos quais os bioprocessos com bactérias magnetotáticas se destacam.

1.2. Bactérias magnetotáticas

As bactérias magnetotáticas (MTB) são um grupo de procariotos aquáticos que possuem como característica diferencial a capacidade de biomineralizar nanopartículas magnéticas de domínio único, compostas normalmente de magnetita ou em alguns casos

greigita (Uebe e Schüler, 2016). Essas partículas, conhecidas pela alta pureza química e perfeição cristalográfica, são naturalmente envoltas por uma vesícula de fosfolipídios com proteínas aderidas a ela. O nanocristal mineral e envoltório biológico formam a organela conhecida como magnetossomo, sendo denominada de nanopartícula magnética de origem biológica (NMOB) quando aplicada em Biotecnologia (Correa, Presciliano e Abreu, 2021).

MTB são organismos polifiléticos com representantes nos filos Alphaprotobacteria, Betaprotobacteria, Deltaprotobacteria, Gammaprotobacteria, Latescibacteria, Nitrospirae, Omnitrophica e Planctomycetes (Abreu e Acosta-Avalos, 2018; Correa e Abreu, 2020; Kawaguchi *et al.*, 1995; Lin e Pan, 2015; Figura 1). Além de apresentarem diversas morfologias como coccus, espirilo, vibrião e bastonete (Lefevre e Bazylnski, 2013) e estilos de vida tanto unicelular quanto multicelular (Morillo *et al.*, 2014; Teng *et al.*, 2018). Recentemente, abordagens de metagenômica e por triagem de bancos de dados públicos o número de filos com MTBs representantes chegou a 16 (Goswami *et al.*, 2022; Figura 2).

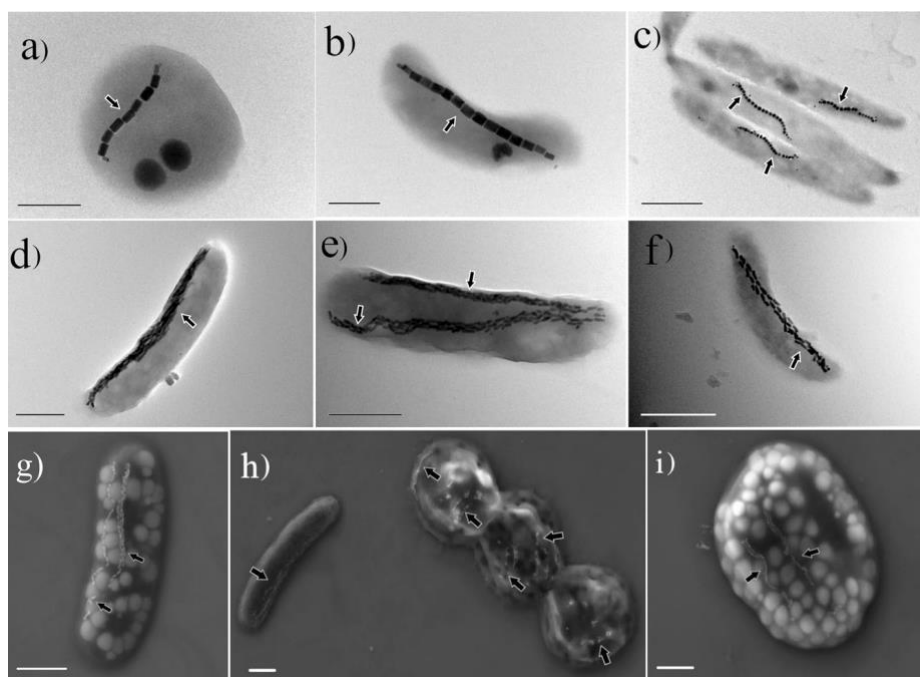


Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (a - f) e microscopia eletrônica de varredura (g - i) mostrando a diversidade morfológica de MTB. Setas pretas indicam a cadeia de magnetossomos. Barras de escala: a, b = 0.5 μm , c-i = 1 μm . Figura Goswami *et al.* (2022).

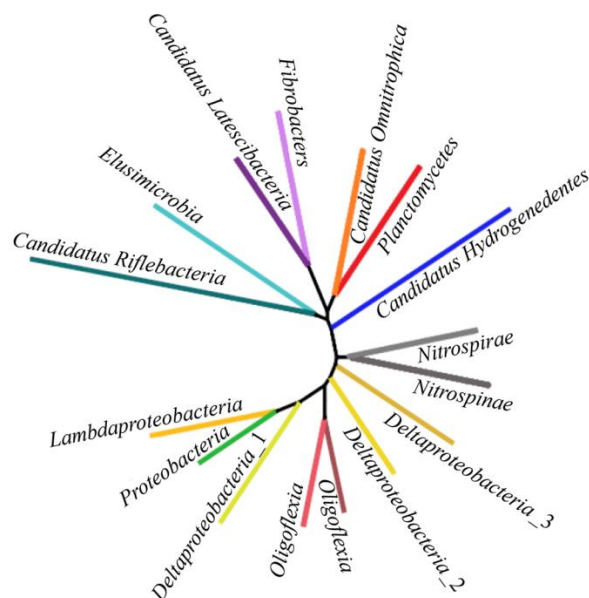


Figura 2. Representação da abrangência de MTB através dos filis do domínio *Bactéria*. Figura de Goswami *et al.* (2022).

MTB possuem uma grande diversidade metabólica e habitam os mais diversos habitats de água doce, salgada ou salobra, incluindo ambientes extremos como lagos alcalinos (Lefèvre *et al.*, 2011), fontes termais (Lefèvre *et al.*, 2010) e região costeira da Antártica (Correa e Abreu, 2020). Essas bactérias, graças a versatilidade metabólica do grupo, assumem papéis importantes para diversos ciclos biogeoquímicos, como do carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e ferro (Li *et al.*, 2021). Relativo ao carbono, com exceção das MTB da classe Deltaprotobacteria, todas tem genes que indicam a capacidade de fixar CO₂, gerar energia a partir do ciclo do ácido tricarboxílico e de fosforilação oxidativa (Li *et al.*, 2021). Ademais, como é comumente descrito em microrganismos anaeróbios, MTB da classe Alphaprotobacteria codificam proteínas necessárias para biossíntese de grânulos ricos em carbono como polihidroxibutirato (PHB) e polihidroxialcanoato (PHA) (Li *et al.*, 2021). A fixação de nitrogênio e redução de nitrato também é uma característica comum que as tornam relevantes para o ciclo do elemento (Dixon e Kahn, 2004).

Os diversos tipos de inclusões intracelulares também são indicativos da relevância de MTB em ciclos como o do fósforo, ao reduzir o conteúdo de fósforo na água e formar grânulos intracelulares de polifosfato, que também podem ser degradados, e contribuem para o acúmulo de fosfato no sedimento e redução do fósforo solúvel (Rivas-Lamelo *et al.*, 2017). De forma similar, MTB participam também do ciclo de enxofre, oxidando e reduzindo sulfeto além de produzir e degradar grânulos de enxofre (Keim *et al.*, 2005). No

contexto do ferro, uma vez que após a morte celular a NMOB pode ser tanto integrado na cadeia alimentar quanto depositado no sedimento (Lefevre e Bazylinski, 2013).

A síntese da NMOB é um processo regulado geneticamente pela família de genes *mam* (*magnetosome membrane*) que juntamente com outros grupos de genes filo-específicos, formam o denominado *magnetosome gene cluster*. Um grupo de cinco operons policistrônicos regulam a síntese da organela (Uebe e Schüler, 2016). Em espécies de *Magnetospirillum* operons são denominados *mamAB*, *feoAB1*, *mamGFDC*, *mms6* e *mamXY*, sendo o primeiro capaz de sustentar a síntese da organela, enquanto os demais vão apresentar funções acessório para o controle de morfologia e tamanho (Uebe e Schüler, 2016). A síntese parte da invaginação da membrana interna para formação da vesícula, simultaneamente ao recrutamento de proteínas; com a vesícula formada, o pH e o potencial redox do microambiente é regulado e com a captação de ferro e oxigênio tem o início a nucleação do cristal; conforme ocorre a maturação do cristal, as NMOBs são ancoradas ao citoesqueleto formado por proteína exclusiva de MTB para o alinhamento em cadeia (Correa *et al.*, 2020; Figura 3).

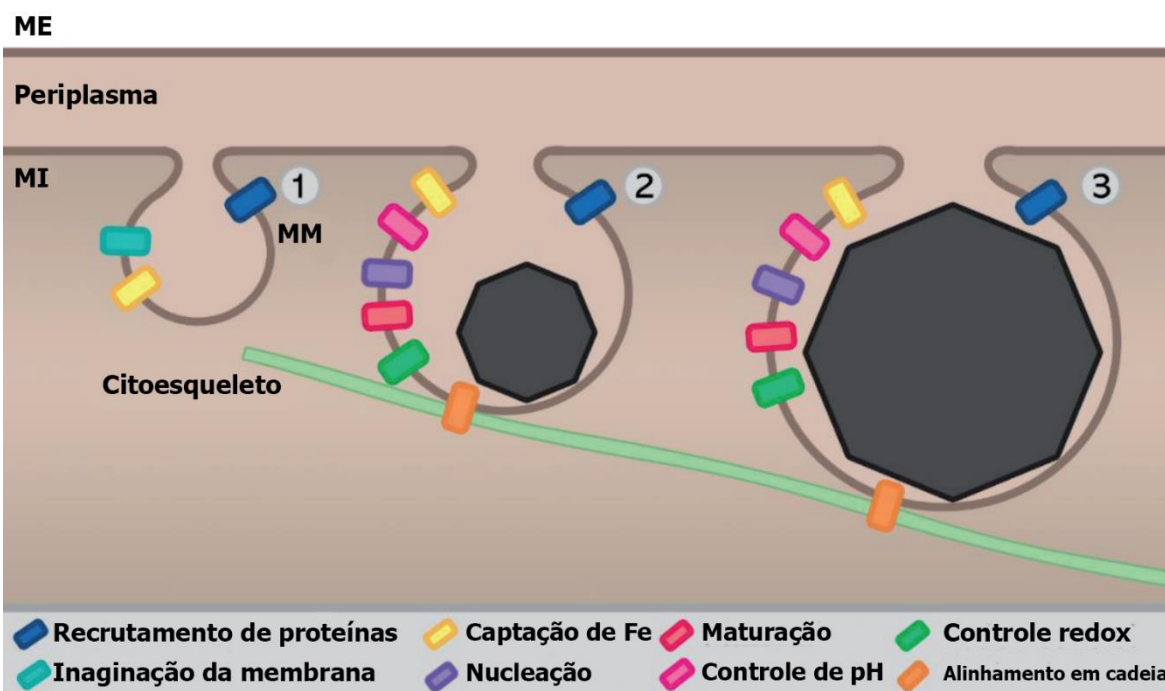


Figura 3. As três principais etapas do processo de síntese do magnetossomo: (1) formação da vesícula a partir da invaginação da membrana interna e o recrutamento de proteínas; (2) nucleação do cristal; (3) maturação do cristal. ME: Membrana externa; MI = Membrana interna; MM = Membrana do magnetossomo. Imagem modificada de Correa et al. (2020).

O alinhamento dos cristais magnéticos ao eixo natatório da bactéria, e a consequente soma dos seus momentos magnéticos individuais possibilitam a natação unidirecional alinhada ao campo geomagnético, compondo fenômeno da magnetotaxia, sendo a mais clara função das NMOBs para célula (Uebe e Schüller, 2016). No ambiente quimicamente estratificado de uma coluna de água, o nado unidirecional, associado a quimiotaxia, facilita a localização da região onde a força próton-motriz para natação flagelar é máxima. Como microrganismos frequentemente microaerófilos, essa região se encontra próxima a zona de transição óxica-anóxica (Lefevre e Bazylinski, 2013).

1.2.1. Bactérias magnetotáticas na biotecnologia

O metabolismo único desses microrganismos, sua responsividade a campos magnéticos externos e capacidade de produzir nanopartículas magnéticas, as tornaram alvo de diversos estudos biotecnológicos (Vargas et al., 2018). No contexto das inovações biomédicas, as propriedades das NMOBs os tornam atraentes para o desenvolvimento de terapias e diagnósticos, imobilização de enzimas e para geração de diversos biocompósitos (Vargas *et al.*, 2018b). Embora as principais aplicações investigadas façam uso das NMOBs,

aplicações envolvendo o uso do próprio microrganismo também são comuns (Arakaki *et al.*, 2002).

No campo da biorremediação, pesquisadores se aproveitam da afinidade desses microrganismos por íons metálicos e capacidade de recuperação magnética, para desenvolver métodos de remediação de metais. *Desulfovibrio magneticus* cepa RS-1 já mostrou potencial para recuperação de cádmio (Arakaki *et al.*, 2002), *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1 foi convertido em biosensor aos ser modificada para expressar luciferase na presença de arsenita (Dieudonné, Prévéral e Pignol, 2020), a mesma espécie também foi capaz de associar urânio dissolvido no meio a parede de peptidoglicana no trabalho de Krawczyk-Bärsch e colaboradores (Krawczyk-Bärsch *et al.*, 2022).

Como organismos acumuladores de fosfato, MTB possuem potencial para a remoção biológica aprimorada de fósforo em estação de tratamentos de água (Li *et al.*, 2021). A intensa retirada do fosforo mineral, motivado principalmente pela indústria de fertilizantes, e a eventual liberação de fosforo na água muito acima da capacidade de remineralização natural desse elemento, causa o desequilíbrio no ecossistema que resulta na eutrofização de ecossistemas aquáticos (Rockström *et al.*, 2009). Poucos estudos buscaram investigar o potencial das MTBs para captura de fósforo. Atualmente Rivas-lamelo e colaboradores visaram quantificar o papel das MTBs na região óxica-anóxica do lago Pavin na França na captura de fósforo e o efeito da variação entre condições óxicas e anóxicas no acúmulo de fósforo por *Ms. magneticum* cepa AMB-1 também foi investigado (Rivas-Lamelo *et al.*, 2017; Su, Bazyliniski e Jensen, 2023).

Voltado para a saúde, NMOBs isoladas são investigados principalmente como ferramentas de diagnósticos, carreadores de fármacos e agentes de contraste em ressonância magnética (Vargas *et al.*, 2018). O revestimento natural das NMOB também facilita processo de ligação de moléculas funcionais à superfície, os fosfolipídios carregados negativamente possibilitam interações eletrostáticas, enquanto a proteínas presentes apresentam grupamentos amina que possibilitam ligações covalentes (Correa *et al.*, 2021). Essa versatilidade pode ainda ser aprimorada através de pré-tratamentos com polímero ou moléculas de ligação cruzada como a poli-L-lisina e glutaraldeído (Correa *et al.*, 2021; Figura 4).

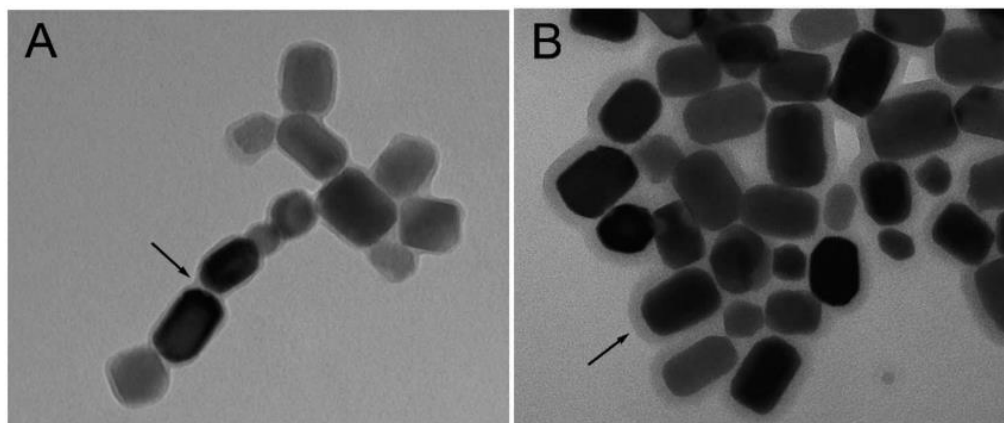


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de NMOBs extraídos de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^Tpuros (A) e funcionalizados com anfotericina b (B), setas pretas indicam a membrana da NMOB. Imagem adaptada de Correa *et al.* (2021).

Formulações farmacêuticas baseadas em NMOB, são principalmente explorados no campo da oncologia, na literatura encontramos formulações utilizando anticorpos (Tang *et al.*, 2019), quimio e radioterápicos como doxorrubicina (DOX) e daunorrubicina (Geng *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2008), peptídeos (Hafsi *et al.*, 2020) e sem modificações (Nan *et al.*, 2021). Na terapia gênica, NMOBs pré-tratadas com polietilenoimina foram utilizadas como uma plataforma para carrear siRNA e inibir o crescimento de células HeLa (Dai *et al.*, 2017). A partir do mesmo pré-tratamento foi avaliado o potencial de um tratamento combinando da quimioterapia, terapia gênica e hipertermia, através da funcionalização de NMOBs com DOX e um plasmídeo recombinante para inibição de um inibidor mitótico, a serem utilizados sobre um campo magnético alternado (Cheng *et al.*, 2016).

Como suportes para nanoformulações, a membrana de fosfolipídios que naturalmente envolve os cristais de magnetita contribui para a segurança em aplicações *in vivo*. No estudo no qual roedores foram acompanhados por 135 dias após uma injeção intravenosa de NMOB de até 32 mg/kg, nenhum dano significativo foi observado (Nan *et al.*, 2021). O mesmo estudo também descreveu a depuração das NMOBs via biliar a curto prazo e a longo prazo o armazenamento no baço com a liberação gradativa no sangue e a consequente liberação via urinária (Nan *et al.*, 2021).

Não limitados apenas à funcionalização química, bactérias do gênero *Magnetospirillum* vem sendo modificadas geneticamente para expressarem na superfície das NMOBs, moléculas funcionais em fusão as proteínas codificadas pelos genes *mam* (Mickoleit, Lanzloth e Schüler, 2020; Mickoleit e Schüler, 2019). O método genético de funcionalização, carrega potencial para construção de compósitos multifuncionais, como o mutante de *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1 capaz de sintetizar uma

NMOB expressando glicose oxidase, glucoronidase, o fluoróforo EGFP e o anticorpo de domínio único para *mCherry* (Mickoleit, Lanzloth e Schüler, 2020, Figura 5). Esse método possui o potencial teórico de expressar até 1500 proteínas fusionadas as proteínas de membrana das NMOBs (Mickoleit, Lanzloth e Schüler, 2020), sendo um método interessante para aplicações na área de biocatálise (Mittmann *et al.*, 2022).

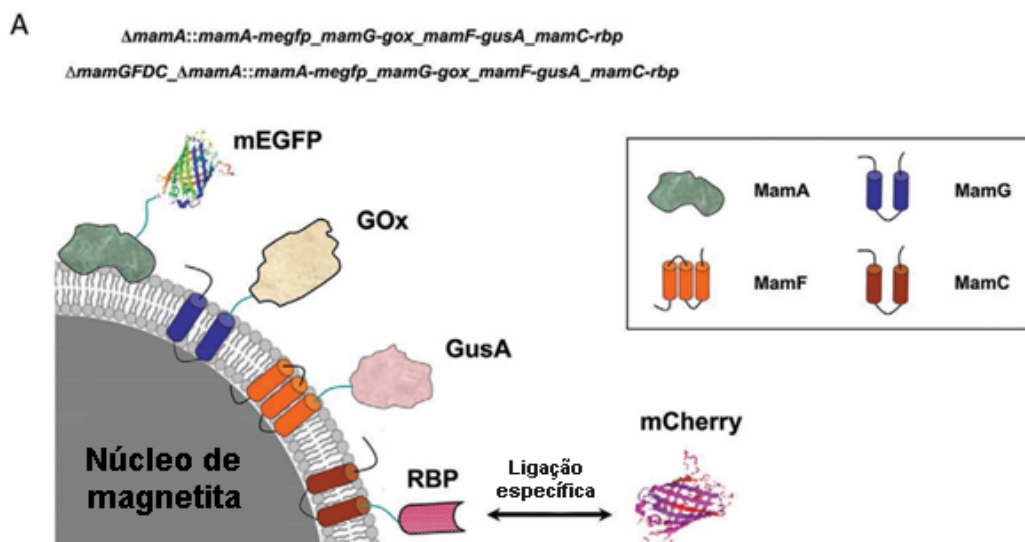


Figura 5. Esquema representativo de NMOB de *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 expressando glicose oxidase (GOx), glucoronidase (GusA), o fluoróforo EGFP (mEGFP) e o anticorpo de domínio único para *mCherry* (RBP) fusionadas respectivamente as proteínas de membrana MamG, ManF, ManA e MamC. Figura retirada de Mickoleit, Lanzloth e Schüler (2020).

Além de provar a viabilidade técnica de aplicações baseadas em NMOBs, esforços também devem ser direcionados a fim de aprimorar a produção em escala e provar sua viabilidade econômica. No campo de bioprocessos, as MTB do gênero *Magnetospirillum* produtoras de cristais cuboctaédricos são protagonistas (Chmykhalo *et al.*, 2021). Para essas células a produção de NMOBs é ótima sobre condições microaerófilas (1% O₂), possivelmente para manter o potencial redox ideal para a síntese das NMOB (Heyen e Schüler, 2003).

Para essas cepas, o meio de cultivo em frasco já foi otimizado quanto às fontes de carbono, nitrogênio e ferro (Heyen e Schüler, 2003). No cultivo em fermentador, Zhang *et al.*, 2011, estudando o efeito da osmolaridade do meio no crescimento celular e na produção de NMOB, atingiu o rendimento recorde de 168,3 mg/litro/dia em um processo semi-contínuo com a espécie *Ms. gryphiswaldense* MSR-1 (Zhang *et al.*, 2011). Tendo esse rendimento como base, Correa *et al.* (2021) fez uma análise econômica comparativa da produção de NMOBs em comparação com nanopartículas sintéticas com características

similares, indicando que NMOBs podem ter um preço mínimo de venda de até 120 vezes menor.

A alteração na estrutura química dos cristais das NMOBs também pode ser realizada através da modulação das condições de cultivo. Jefremovas *et al.* (2022) fez o cultivo em frasco de *Ms. gryphiswaldense* com a adição 100 μM de quinato de térbio ou gadolínio e observou que os metais na forma de Tb^{+3} e Gd^{+3} era incorporado à estrutura das NMOBs substituindo na proporção de 3 – 4% os íons Fe^{3+} e consequentemente alteração nas propriedades magnéticas (Jefremovas *et al.*, 2022). De forma similar, o mesmo foi observado anteriormente utilizando cobalto e manganês (Li *et al.*, 2016; Prozorov *et al.*, 2014).

Em termos de mercado, a estabilidade de armazenamento a longo prazo é um aspecto fundamental. Nesse contexto, Mickoleit e colaboradores (2023) avaliaram a estabilidade, biocompatibilidade e magnetização de NMOBs de *Ms. gryphiswaldense* após um ano de armazenamento em tampão HEPES e atmosfera inerte a 4°C. De acordo com os achados, as NMOBs sofreram perda de magnetização, no entanto, a integridade da membrana, a estabilidade coloidal e a biocompatibilidade não foram prejudicadas de forma significativa (Mickoleit *et al.*, 2023). Ainda nesse cenário, o caso de cristais de magnetita biogênica encontradas em camadas de sedimento, os chamados magnetofósseis, mantiveram suas características cristalógrafas por milhares de anos, sendo mais um indicativo da alta estabilidade desses cristais (Goswami *et al.*, 2022).

Além dos espirilos, a MTB *Magnetivibrio blakemorei* cepa MV-1^T, produtora de NMOBs de magnetita de morfologia prismática, também foi alvo de estudos focados em bioprocessos, tanto para a otimização do cultivo em frasco quanto para o processo no fermentador (Silva *et al.*, 2013). No processo otimizado de cultivo a *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T apresenta crescimento heterotrófico, usando succinato como principal fonte de carbono, em condições anaeróbicas usando N_2O como acceptor final de elétrons (Silva *et al.*, 2013), nitrato e nitrito também podem assumir esse papel (Bazyliniski *et al.*, 2013). De forma não ótima, a bactéria cresce em ambientes microaerófilos utilizando sulfeto, formato ou tiosulfato, sendo também capaz de fixar CO_2 para crescer de forma autotrófica (Bazyliniski *et al.*, 2013).

Mesmo com a diversidade de espécies em culturas axênicas atualmente, nem um outro gênero de MTB é foco de estudos para bioprocessos, assim, a produção de NMOBs ficam restritas às morfologias prismáticas e cuboctaédricas. A atual metodologia de cultivo de

MTB produtoras de cristais octaedros truncados, como a *Magnetofaba australis* cepa IT-1 é inespecífica e pouco se sabe sobre seu potencial para bioprocessos, mesmo produzindo uma massa de magnetita por célula superior aos espirilos mais estudados (Morillo *et al.*, 2014).

A diferença de morfologia e química de superfície também implicam na eficiência quanto a aplicações específicas. No contexto de hipertermia magnética, a eficiência da conversão da energia eletromagnética em calor varia com a morfologia da partícula, por exemplo, partículas octaédricas tem um potencial de aquecimento maior que nanopartículas cúbicas que por sua vez já tem potencial quase duas vezes maior que nanopartículas esféricas (Fatima, Charinpanitkul e Kim, 2021).

Ainda, alguns fatores podem afetar a capacidade de ligação de moléculas em sua superfície, como diferentes morfologias que apresentam faces com área que variam em extensão além de que diferentes espécies de MTB podem variar quanto a natureza e quantidade de proteínas na superfície das NMOBs. Além disso, sabe-se que proteínas da superfície de NMOBs podem preservar sua função mesmo após extraídas (Xu *et al.*, 2022), assim explorar o potencial de novas proteínas em um novo gênero de MTB pode configurar um potencial biotecnológico inexplorado.

1.3. A *Magnetofaba australis* cepa IT-1

Magnetofaba australis cepa IT-1 é uma MTB isolada das águas salobras da lagoa de Itaipú no estado do Rio de Janeiro, Brasil, é uma alfa protobactéria flagelada da família *Magnetococcaceae* que compõem o gênero *Magnetofaba* (Figura 3), sua morfologia é definida por uma face côncava e outra convexa bem definida (Morillo *et al.*, 2014). Após a *Magnetococcus marinus* cepa MC-1 e *Magnetococcus massalia* cepa MO-1 foi apenas o terceiro exemplar da família a ser mantido em cultura, no entanto é uma família muito presente em amostras ambientais (Koziaeva *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Rivas-Lamelo *et al.*, 2017).

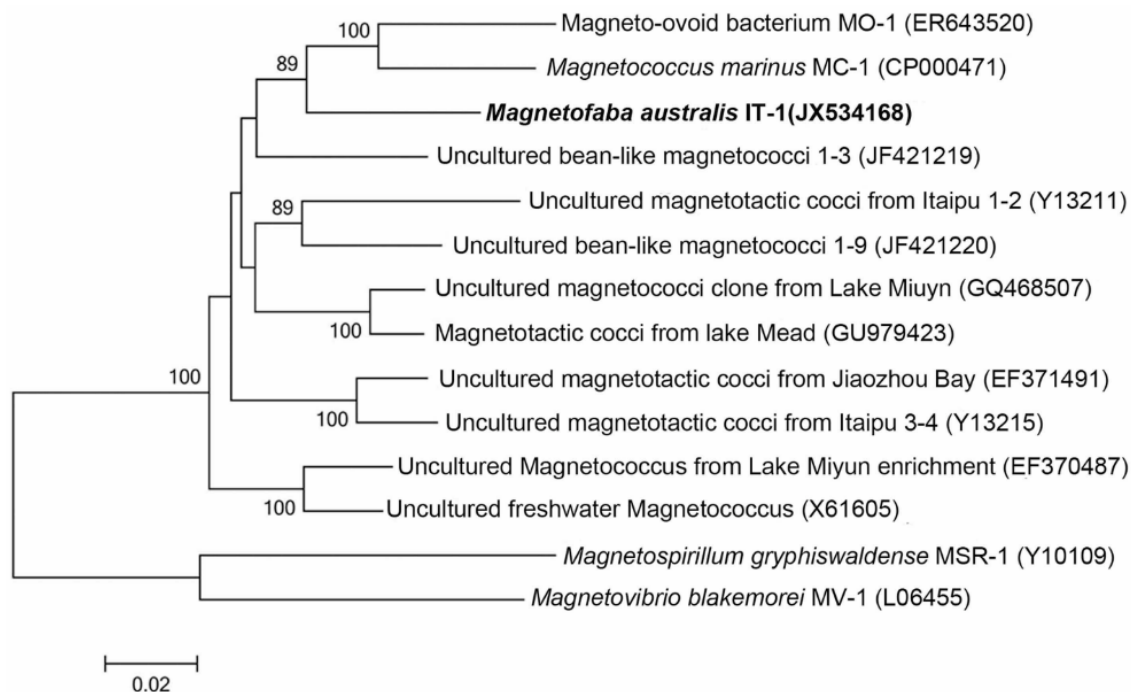


Figura 6. Análise filogenética baseado nos genes rRNA 16S da *Mf. australis* cepa IT-1 compondo um novo gênero dentro de *Alphaprotobacteria* (Morillo *et al.*, 2014).

Mf. australis cepa IT-1 é cultivada em condições microaerófilas e quimiolitotróficamente utilizando tiosulfato como doador de elétrons e com uma fonte autotrófica de carbono, provavelmente pelo Ciclo de Krebs reverso, também sendo capaz de consumir fontes heterotróficas de carbono (Araujo *et al.*, 2016). A espécie é capaz de produzir NMOBs de magnetita de morfologia octaedro truncado, e outros dois grânulos intracelulares, de enxofre e polifosfato, que são reflexo da plasticidade do genoma adaptado para sobrevivência em ambientes sob mudança constante (Araujo *et al.*, 2016; Morillo *et al.*, 2014).

O genoma de *Mf. australis* codifica um amplo aparato de proteínas para a captura, transporte e regulação do ferro, incluindo: Transportadores do tipo ABC, que atuam no transporte dependente de ATP de solutos para o interior da célula; Ferritinas que podem atuar na detoxificação de ferro, oxidação de Fe^{2+} armazenamento de Fe^{3+} e a liberação controlada de ferro; e hemeritina que atua na homeostase das condições redox no interior da célula (Araujo *et al.*, 2016). 9 regiões no genoma que codificam proteínas envolvidas na proteção contra espécies reativas de oxigênio (Araujo *et al.*, 2016). Todo esse potencial

molecular descreve funções importantes tanto para a formação de NMOBs quanto para o crescimento celular.

Quanto ao metabolismo de enxofre, a *Mf. australis* cepa IT-1 possui dois genes que codificam a redução de enxofre, de sulfato para adenil sulfato, seis outros genes para redução dissimulatória de sulfato para sulfeto, genes envolvidos na oxidação de compostos reduzidos direto para sulfato também estão presentes (Araujo *et al.*, 2016). O gene que codifica a sulfato quinona redutase envolvido na formação dos grânulos de enxofre também está presente no genoma de *Mf. australis* cepa IT-1. Apesar da espécie ser capaz de reduzir sulfato, não é capaz de crescer sobre anaerobiose utilizando sulfato como acceptor único de elétrons (Araujo *et al.*, 2016).

O metabolismo de fósforo de *Mf. australis* cepa IT-1 se destaca devido ao volume de grânulos de polifosfato que a célula é capaz de armazenar. Em seu genoma genes envolvidos na captação e absorção estão codificados, bem como genes para transportadores de fósforo de alta afinidade, uma permease e transportadores de fosfonato (Araujo *et al.*, 2016). Além da polifosfato quinase e exopolifosfatase envolvidos na formação dos grânulos, que devido à alta afinidade na captação de fósforo pode ser formados mesmo em ambientes com concentrações baixas de fósforo (Araujo *et al.*, 2016).

Mesmo após os estudos relacionados a produção de NMOBs, a metodologia de cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 ainda é baseada em uma formulação generalista. Assim, pouco se sabe sobre os fatores que influenciam na velocidade de crescimento e na produção de NMOBs pela célula. De forma alternativa, entender os fatores que podem influenciar no crescimento e na produção de grânulos também podem possibilitar aplicações para própria célula. Além disso, explorar um novo gênero de MTB também pode implicar em um potencial funcional inédito de suas proteínas de superfície.

1.4. Otimização de bioprocessos

As primeiras tentativas de cultivar microrganismos datam no início do século 19, nas quais as técnicas de cultivo se baseavam na utilização de materiais ou alimentos onde o crescimento de microrganismos era observado naturalmente (Sandle, 2011). Ainda no século 19, o microbiologista Louis Pasteur desenvolveu a primeira metodologia definida e reprodutível de cultivo de microrganismos, misturando sal de amônio (fonte de nitrogênio), açúcar (fonte de carbono) e cinzas (fonte de vitaminas) (Sandle, 2011).

Pasteur também observou que as propriedades químicas dos componentes do meio podiam favorecer certos microrganismos em detrimento de outros (Sandle, 2011). Assim, na medida em que o conhecimento sobre vias metabólicas, coenzimas e fatores de crescimento avançava, no início do século 20, meios seletivos começaram a ser desenvolvidos, nos quais microrganismos sem determinada característica tinham seu crescimento inibido, assim, as primeiras culturas axênicas foram estabelecidas (Sandle, 2011).

Décadas mais tarde, impulsionado pela descoberta da penicilina, a evolução dos processos fermentativos, da biologia molecular e da engenharia metabólica, meios de cultivo puderam ser desenvolvidos a fim de estimular vias metabólicas específicas para a produção de um produto (Buchholz e Collins, 2013). No entanto, a otimização de meios de cultivo se provou um processo temeroso e pouco eficiente, o elevado número de fatores envolvidos no processo de cultivo torna a experimentação a fim de chegar nas condições ótimas de cultivo custoso e pouco eficiente, se realizadas por meio tradicionais onde um fator é analisado por vez.

A partir dessa problemática, as metodologias de planejamento estatístico começaram a ser exploradas com o objetivo de reduzir o número de experimentos necessários sem comprometer a confiabilidade dos resultados (Singh *et al.*, 2017). Essas metodologias se fundamentam em princípios matemáticos para o planejamento racional de experimentos bem como suas análises. Nessa abordagem, a otimização do processo é feita em duas etapas: o *screening* e a construção da superfície de resposta, onde a primeira se preocupa em avaliar quais componentes possuem efeitos significativos sobre a resposta e a segunda se preocupa em otimizar o nível dessas variáveis (Montgomery, 2012).

Historicamente, o planejamento estatístico se consolidou no desenvolvimento de processos químicos, mas recentemente vem sendo cada vez mais explorado para a otimização de bioprocessos (Singh *et al.*, 2017). Aplicada a formulação de meios de cultivo, já foi possível, por exemplo, aprimorar o rendimento de L-alanina pela cepa recombinante de *Pediococcus acidilactici* a níveis superiores aos atingidos pelas abordagens de engenharia genética (Sharma *et al.*, 2022). Além de otimizar meio de cultivo, o planejamento estatístico também é aplicado para investigar o efeito de diferentes condições de cultivo sobre diferentes linhagens celulares (Knöspel *et al.*, 2010)

Comumente, bioprocessos são aperfeiçoados a partir de experimentos planejados a partir do conhecimento sobre a genética e biologia celular do organismo modelo. A própria otimização da produção de NMOBs da bactéria magnetotática *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1, foi feita a partir da correlação observada entre a pressão osmótica do meio e a produção de NMOBs (Zhang *et al.*, 2011). De forma distinta, abordagens baseadas em engenharia genética também são utilizadas para aumentar a produção de NMOBs (Zwiener *et al.*, 2021).

Mais recentemente, com as particularidades de um sistema biológico, métodos estatísticos de otimização vêm sendo combinados com ferramentas mais avançadas como o aprendizado de máquinas, onde o planejamento estatístico pode guiar o aprendizado do algoritmo (Luca, De *et al.*, 2023). Abordagens *in silico* também vem ganhando espaço na otimização de meios de cultivo e bioprocessos. Por exemplo, Pérez-Fernández *et al.* (2020) partiu de uma reconstrução metabólica a partir do genoma de células CHO-K1 para prever a concentração de certos metabólitos e principalmente para otimizar um processo contínuo de produção (Pérez-Fernández *et al.*, 2021).

2. Justificativa

Diversas áreas da indústria contam com inovações com base nanotecnológica para se manterem competitivas no mercado. Para isso, tornar a produção de nanomateriais sustentável tanto ambientalmente quanto economicamente é essencial. Especificamente as nanopartículas magnéticas recebem a atenção da indústria farmacêutica para aplicações em carregamento de fármaco, agentes de contraste de ressonância magnética, para tratamentos por hipertermia entre outras (Ali *et al.*, 2021a).

Atualmente diversas vias de síntese de nanopartículas magnéticas são conhecidas, sendo as vias de síntese química as mais utilizadas, mesmo apresentando problemas relacionados ao controle do tamanho e morfologia das partículas e geração efluentes tóxicos. Como alternativa, a síntese biológica, através do cultivo em larga escala de MTB rende nanopartículas de grande potencial biomédico devido a sua pureza, perfeição cristalográfica, seu revestimento natural e o custo reduzido em comparação com a síntese química de nanopartículas com as mesmas características (Correa, Presciliano e Abreu, 2021).

Mesmo já tendo bioprocessos bem descritos para as MTB *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1, que produzem NMOBs cuboctaédricos e *Magnetovibrio*

blakemorei cepa MV-1^T, produtora de NMOBs prismáticos (Silva *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011), NMOBs de diferentes espécies variam quanto a sua morfologia, área de superfície e perfil de proteínas, fatores que influenciam no potencial de funcionalização das NMOBs. Bactérias produtoras de NMOBs de morfologia octaedro truncado, como a *Magnetofaba australis* cepa IT-1, nunca foram estudadas com uma abordagem biotecnológica, por isso, a otimização das condições de cultivo da *Mf. Australis* cepa IT-1 é essencial para expandir o potencial de aplicações das NMOBs e das MTBs.

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

Avaliar, qualitativamente e quantitativamente, o efeito de alterações na formulação do meio no cultivo da bactéria *Mf. Australis* cepa IT-1 visando melhorar a produção de NMOBs.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1 Desenvolver modelo de predição metabólica na plataforma KBase a fim de avaliar as fontes de carbono, nitrogênio e elementos traços a serem avaliados.

3.2.2 Avaliar o crescimento celular, produção de NMOBs/célula e área média de grânulos/célula em vista da utilização de diferentes fontes de carbono.

3.2.3 Avaliar o efeito da adição de extrato de levedura e da adição dos componentes auxotróficos no crescimento celular, produção de NMOBs/célula e área média de grânulos/célula.

3.2.4 Definir as variáveis mais significativas para o rendimento final de NMOBs.

3.2.5 Otimizar o nível das variáveis definidas como mais significativas para o rendimento de NMOBs.

4. Metodologia

4.1. Cultivo de células de *Mf. australis* cepa IT-1

O cultivo de células de *Mf. australis* cepa IT-1 foi feito em tubos de ensaio contendo meio semissólido com fontes heterotrófico e autotróficas para cocos marinhos com gradiente de oxigênio como descrito por Morillo *et al* (2014).

4.2. Quantificação de células de *Magnetofaba australis* cepa IT-1

Para quantificar o número de células de forma prática ao longo do projeto, foi feita a correlação entre a densidade óptica da suspensão de células no comprimento de onda de 600 nm e a contagem direta das células feitas por microscopia óptica de fluorescência. Para isso, as células foram cultivadas em meio semissólido por 10 dias e 3 bandas de crescimento foram coletadas e avolumadas para o volume final de 10 ml com água do mar artificial. A partir dessa solução, será coletada uma amostra direta e mais três amostras diluídas em 2, 3 e 6 vezes para medida da densidade óptica, as mesmas amostras foram fixadas com formaldeído para uma concentração final de 4% e novamente diluídas em 25 vezes e preparadas para microscopia óptica de fluorescência.

4.2.1. Contagem direta por microscopia óptica de fluorescência

As amostras foram filtradas em uma membrana de policarbonato hidratado com água MilliQ sobre um filtro AP-20 com tamanho de poros de 0,22 µm. A membrana, com as células aderidas a ela, foi transferida para uma lâmina de vidro e a área com células foi coberta com solução de DAPI (1 mg/ml) que ficou reagindo por 5 minutos protegido da luz. O excesso de DAPI foi lavado com PBS, a amostra foi coberta com N-propilgalato e em seguida coberto com uma lamínula e direcionada para observação do microscópio Zeiss Axioimager (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipado com modo de microscopia de fluorescência.

Para cada lâmina, imagens de 10 quadrantes foram feitas e as células serão contadas em cada uma delas usando o software ImageJ (Schneider, Rasband e Eliceiri, 2012), a partir disso o número de células em cada amostra será calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$6. N^{\circ} \text{ de células} = \frac{\text{Contagem média por campo} * \left(\frac{\text{Área total}}{\text{Área do campo}} \right)}{\text{Volume da amostra}}$$

4.2.2. Regressão linear -

A regressão linear simples foi feita entre a densidade óptica e o número médio de células em cada uma das diluições utilizando o software Prism 8.0 (GraphPad) para construção da reta e estatísticas de adequação.

4.2.3. Contagem por citometria de fluxo

A abundância dos microrganismos foi obtida por citometria de fluxo sendo utilizado um citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, Inc), equipado com 3 lasers: laser azul de 488 nm com 50 mW; laser vermelho de 638nm com 50 mW; laser Violeta de 405 nm com 80 mW de potência. A luz fluorescente e de dispersão lateral (SSC) coletada pela lente objetiva é fornecida por fibra óptica ao conjunto de detectores de alto desempenho com capacidade de leitura para até 13 cores. A detecção de luz frontal é captada por um fotodiodo integrado a um filtro 488/8 (band-pass). Para análise de células procarióticas no presente estudo foram utilizados os canais verdes (520 ± 20 nm), laranja (585 ± 21 nm) e vermelho (670 ± 25 nm). O “Trigger” foi ajustado para a fluorescência verde e água MilliQ foi utilizada como carreadora. Como controle interno e calibração das contagens no citômetro de fluxo, foi utilizada uma solução de microesferas fluorescentes (Fluoresbrite YG carboxilate 1,0 μ m, Polysciences). Amostras foram fixadas com solução de paraformaldeído a 1 % (concentração final). A enumeração de células foi realizada após a marcação de ácidos nucleicos com a adição do fluorocromo Sybr Green I (a concentração final de 5×10^{-5} da solução estoque comercial; Molecular Probes) e incubação de 15 minutos ao abrigo da luz. Os grupos celulares foram discriminados usando uma combinação de SSC (Side Scatter light - espalhamento lateral a 90°) e da intensidade de fluorescência verde, relacionado com o conteúdo de ácido nucleico (Cabral et al., 2017; Josep M. Gasol e del Giorgio, 2000)

4.3. Curva de crescimento

As curvas de crescimento foram feitas a partir de tubos de ensaio contendo 10 ml de meio semissólido de cultura, inoculados com 20 μ l de uma suspensão de células que serão semeadas na altura referenciada pelo fim do gradiente de cor dos tubos de referência contendo resazurina, a fim de padronizar a concentração de oxigênio na região de inóculo em cada tubo. A suspensão de células foi feita pela mistura de 1 ml de 2 bandas de crescimento, que após homogeneizadas em um tubo de polipropileno estéril tem sua densidade ótica à 600 nm mensurada, a partir da correlação pré-estabelecida é estabelecido o número de células

Para cada ponto da curva de crescimento, todo o crescimento celular visível foi removido do tubo e homogeneizado em um microtubo, em seguida, foi mensurado a densidade ótica à 600 nm da suspensão de células para ser feita a correlação entre a densidade ótica e o número de células. A quantificação foi feita nos tempos de tempo de 0,

8, 24, 32, 48, 56 e 64 horas, cada ponto corresponde à média do número de células em 3 tubos. No ponto de 48 horas foi preparada uma grade de microscopia eletrônica de transmissão para a contagem de magnetossomos/célula.

A significância estatística da diferença entre número de célula entre cada ponto do tempo foi feita pelo teste de comparação múltipla de Tukey com Alfa = 0,05 utilizando o software Prism 8.0 (GraphPad).

4.4. Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras para microscopia eletrônica foram preparadas depositando 2 µl de água ultrapura sobre a grade de cobre 300 Mesh (Electron Microscopy Sciences, US) revestida com formar e carbono, 2 µl de uma suspensão de células foram depositadas ao lado da gota, em seguida um ima foi posicionado de forma a induzirem as células a nadarem em direção a água sobre a grade. Após cerca de 15 minutos, onde a grade foi deixada sob proteção de uma placa de vidro para secar, o excesso de água foi removido usando um papel de filtro. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram feitas no microscópio FEI Morgagni, (FEI Company, Hillsboro, OR, EUA) operado a 80 kV.

4.4.1. Análise das imagens de MET

A contagem de NMOBs por células e a análise do volume dos grânulos foram feitas a partir das imagens de microscopia eletrônica de transmissão utilizando o software ImageJ (Schneider, Rasband e Eliceiri, 2012), para cada imagem o brilho e o contraste foram ajustados com objetivo de destacar a presença de inclusões nas células. Os gráficos e análises estatísticas foram feitos com o software Prism 8.0(GraphPad)

4.4.2. Rendimento de NMOBs

O cálculo de rendimento de NMOBs foi feito pela multiplicação do número de células pelo média de NMOBs por célula para aquele ponto no tempo. A estatística foi feita a partir do desvio padrão do número de NMOBs por célula multiplicado pela média do número de células. A significância estatística foi dada para $P < 0,05$ a partir e múltiplos testes T.

4.4.3. Exclusão e substituição de fontes de carbono

A partir meio padrão com 2 fontes heterotróficas de carbono (succinato de sódio e acetato de sódio) e 1 fonte autotrófica de carbono (bicarbonato de sódio), foi avaliado a utilização de uma única fonte heterotrófica única de carbono. Para isso foram avaliados ao crescimento celular e o rendimento de NMOBs com os meios com as seguintes fontes únicas de carbono: succinato de sódio, acetato de sódio além do meio padrão. Todas ajustadas para equivalerem a mesma concentração final de átomos de carbono do meio base, sendo assim foram adicionados no meio de cultura 1,59g/L e 1,6g/L das fontes únicas de carbono, respectivamente.

4.4.4. Adição de extrato de levedura

A adição de extrato de levedura ao meio padrão do cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 foi feita a fim de equiparar a concentração utilizada para o cultivo de *Magnetospirillum* descrito por Heyen e Schüler (2003) de 0,1 g por litro de meio. A fim de avaliar o efeito da mudança no protocolo, as células foram inoculadas no meio novo e após a segunda geração de células cultivadas nesse meio uma curva de crescimento foi feita como descrito anteriormente e após 48 horas de crescimento as células foram depositadas em uma grade de microscopia eletrônica para avaliação de NMOBs/célula.

4.4.5. Substituição e remoção da solução de vitaminas

Para avaliação do efeito dos componentes auxotróficos em detrimento da solução de vitaminas padrão, a partir do meio padrão de foram feitas duas formulações, a primeira onde a solução de vitaminas foi omitida e uma segunda na qual foi feita a substituição da solução de vitaminas pela solução de componentes auxotróficos (Tabela 1), com o mesmo volume final. A fim de estimar o efeito da troca dos componentes traço e da sua remoção total, após a segunda geração de células de *Mf. australis* cepa IT-1 o crescimento celular foi quantificado em quadruplicata por citometria de fluxo.

Tabela 1 Composição da solução de componentes auxotróficos

Solução de componentes auxotróficos		
Água Milli-Q	100 mL	Unidade
Folato	5	mg
Glicina	5	mg
L-metionina	5	mg
L-serina	5	mg
Espermidina	5	mg

4.4.6. Remoção da fonte de ferro

O efeito da ausência de ferro no crescimento celular foi avaliado a partir da remoção da fonte de ferro da formulação do meio padrão. Para garantir a ausência de qualquer traço de ferro, por 3 vezes, toda a vidraria utilizada para a confecção do meio foi submetida a um banho de ácido nítrico (10%) por 30 minutos com subsequente descarte do volume e lavagem com água MilliQ. Para certificar a ausência de ferro no meio, 3 passagens subsequentes de células de *Mf. australis* cepa IT-1 foram feitas, a não produção de BMs foi confirmada pela ausência de resposta ao campo magnético observada por microscopia óptica em modo de contraste interferência diferencial.

4.5. Avaliação de custos

A avaliação dos custos envolvidos no bioprocessamento de *Mf. australis* cepa IT-1 teve como base a formulação do meio líquido para bactérias magnetotáticas marinhas (Tabela 2). Os preços foram baseados na cotação da Merck (www.sigmaaldrich.com).

Tabela 2. Composição do meio líquido de cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1.

ASW	1000 mL
HEPES	2.4 g
Cloreto de amônia	0.3 g
Acetato de sódio	1 g
Succinato de sódio	1 g
Bicarbonato de sódio	1,28 g
L-cisteína 3%	6500 µl
Fe ₂ SO ₄ a 10mM (µL)	3000 µl
K ₂ HPO ₄ a 1,86%	1500 µl
Tiosulfato de sódio a 40%	500 µl
Minerais de Wolfe	5000 µl
Solução de vitaminas	500 µl

4.6. Modelagem metabólica

O modelo de predição metabólica para a *Mf. australis* cepa IT-1 foi feito usando a plataforma *KBase: Predictive biology*. Inicialmente, o genoma da célula foi anotado no

aplicativo “*Annotate Microbial Genome with RASTtk - v1.073*” a partir do genoma parcial com 21 contigs.

O modelo metabólico foi gerado com o aplicativo “*Build Metabolic Model V 2.0.0*” a partir do genoma parcial da célula e do meio padrão de crescimento para coccus magnéticos marinhos para *gapfilling*, o modelo resultante foi caracterizado com o aplicativo “*Run model characterization*”. A fim dar mais confiabilidade ao modelo, o aplicativo também foi utilizado para gerar um modelo metabólico para a MTB *Magnetococcus marinuscepa* MC-1, por ser filogeneticamente próxima a *Mf. australis* cepa IT-1 e ter o genoma completamente sequenciado. Usando o aplicativo “*Compare models V 2.0.0*”, foi analisado a semelhança entre os dois modelos. A partir dos modelos gerados serão analisados os elementos traços e vitaminas presentes no metabolismo da célula, bem como analisar elementos auxotróficos para o metabolismo das células, essas informações foram utilizadas como base para análises de balanço de fluxo.

4.7. Análise de balanço de fluxo

As análises de balanço de fluxo, para quantificar o potencial máximo de geração de biomassa, foram feitas na plataforma *KBase: Predictive biology* utilizando o aplicativo “*Run flux balance analysis*”. As análises foram feitas para o modelo metabólico estabelecido previamente alimentando o programa com diferentes formulações de meio, a princípio para avaliar o efeito de diferentes fontes únicas de carbono, em seguida, os mesmos meios serão modificados para conterem os componentes auxotróficos para *Mf. australis* cepa IT-1.

4.8. Avaliação de vias metabólicas

Usando o banco de dados referente *Mf. australis* cepa IT-1, *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1 e *Magnetovibrio blakemorei* cepa MV-1 da plataforma BioCyc. Usando a aplicação Pathway tools ontology, a pontuação relativa à presença de enzimas que catalisam as reações necessárias e se o organismo está dentro da classificação taxonômica adequada para a reação prevista. Usando o software Prism 8.0 (GraphPad), foi construído um mapa de calor comparando vias metabólicas relativas ao metabolismo energético, de fósforo, nitrogênio e enxofre para cada dos organismos mencionados.

4.9. Avaliação do efeito da variação das concentrações dos componentes do meio cultivo

Os componentes selecionados nessa etapa, definidos de acordo com a composição do meio padrão, foram a razão entre a concentração de carbono e nitrogênio, a quantidade de solução de minerais, agente redutor, fonte de ferro, solução de vitaminas, doador de elétrons e fonte de fósforo (Tabela 3). A matriz de experimentos foi construída tendo como base a matriz do planejamento Plackett & Burman para 8 experimentos. Nessa etapa, o número de células após 48 horas de crescimento, quantificado por citometria de fluxo, foi utilizado como a resposta padrão.

O efeito médio foi definido pela fórmula:

$$\text{Efeito médio de } X = \frac{\text{Efeito positivo médio} + \text{Efeito negativo médio}}{\text{Crescimento celular médio entre os experimentos}}$$

Onde X é o componente em questão e o efeito positivo médio foi dado pela média entre a respostas dos experimentos onde o componente X se encontra em seu nível superior. O efeito negativo médio foi calculado a partir da média do produto entre -1 e as respostas onde o componente X se encontra negativo.

Tabela 3. Variáveis selecionadas com seus respectivos níveis a serem avaliados.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Razão C/N (X₁)	6,77	13,55	20,32
Sol. minerais (X₂)	0,1%	1,3%	2,5%
Cisteína 3% (X₃)	0,325%	0,65%	0,975%
Quinato férrico 10 mM (X₄)	5 mM	20 mM	35 mM
Sol. vitaminas (X₅)	0%	0,05%	0,1%
Tiosulfato de sódio 40% (X₆)	0,02mM	0,1 mM	0,18 mM
Fosfato dipotássico 1,86% (X₇)	0,341mM	3,41M	5,467mM

5. Resultados

5.1. Modelagem metabólica e análise de balanço de fluxo

O modelo metabólico foi feito na plataforma *Kbase: predictive biology* a partir da versão mais recente do genoma publicado da *Mf. australis* cepa IT-1 com 21 contigs e

utilizando o meio para coccus magnéticos como referência para *Gap-filling*. O modelo chegou a 1012 reações, das quais 71 foram *Gap-fillings*, 1092 compostos a partir de 4,214 genes. Dentre todos os minerais e vitaminas presentes na composição original do meio, apenas alumínio, boro e vitamina B10 não estão presentes em qualquer reação no metabolismo da célula. O modelo metabólico indicou cinco moléculas que são auxotróficas no metabolismo de *Mf. australis* cepa IT-1, estas sendo, folato, glicina, l-metionina, l-serina e espermidina. Dentre elas, apenas folato está presente no meio de cultivo padrão.

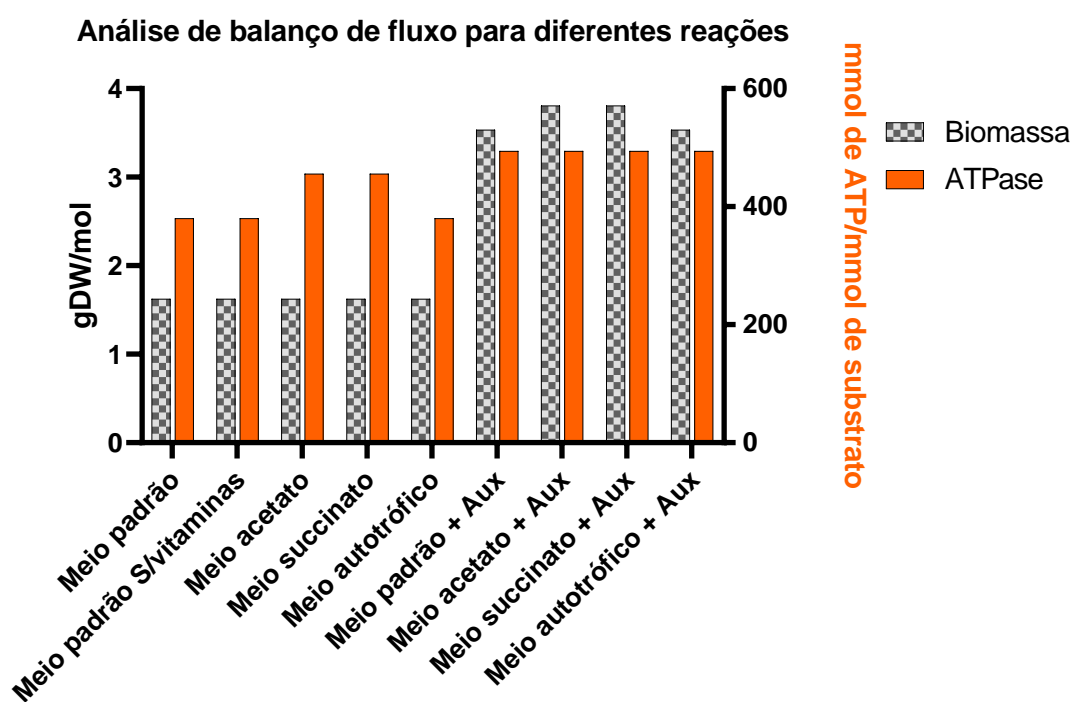


Figura 7. Análise de balanço de fluxo para o modelo metabólico de *Mf. australis* cepa IT-1 em diferentes condições de cultivo para diferentes funções objetivas, produção de biomassa e atividade da ATPase.

As análises de balanço de fluxo foram feitas usando a plataforma Kbase utilizando a reconstrução da modelagem metabólica descrita anteriormente, cada simulação feita utilizando o meio padrão e outros meio modificados a partir dele, usando fontes únicas de carbono e novamente com a adição de componentes auxotróficos. Diferentes simulações foram feitas para as seguintes funções objetivas:

- 1) **Biomassa:** $Síntese\ de\ proteína[c0] + (0.35)\ L\text{-Valina}[c0] + (0.15)\ L\text{-fenilalanina}[c0] + (0.08)\ L\text{-Histidina}[c0] + (0.18)\ L\text{-Prolina}[c0] + (0.03)\ bactoprenil\ difosfato}[c0] + (0.08)\ L\text{-cisteína}[c0] + (0.22)\ L\text{-glutamato}[c0] +$

(0.02) $dGTP[c0]$ + (0.29) $L\text{-Lisina}[c0]$ + (0.01) $dATP[c0]$ + (0.38) $L\text{-Leucina}[c0]$ + (0.2) $L\text{-Aspartato}[c0]$ + *Transcrição de RNA*[c0] + (0.18) $L\text{-Serina}[c0]$ + (0.43) $L\text{-Alanina}[c0]$ + (0.02) $dCTP[c0]$ + (0.03) *Fosfatidilglicerol dioctadecanil* [c0] + (0.05) $L\text{-Triptofano}[c0]$ + (40.11) $ATP[c0]$ + (0.24) $L\text{-Isoleucina}[c0]$ + (0.08) $CTP[c0]$ + (35.54) $H_2O[c0]$ + (0.14) $GTP[c0]$ + (0.01) $TTP[c0]$ + (0.03) *Stereo cardiolipnia (B. subtilis)*[c0] + (0.12) $L\text{-Tirosina}[c0]$ + (0.25) $L\text{-Arginina}[c0]$ + (0.22) $L\text{-Glutamina}[c0]$ + (0.03) *core oligosaccharide lipid A*[c0] + (0.51) $Glicina[c0]$ + (0.09) $UTP[c0]$ + (0.13) $L\text{-Metionina}[c0]$ + (0.2) $L\text{-Asparagina}[c0]$ + (0.03) *Polímero de peptideoglicana (n subunidades)*[c0] + *Replicação do DNA*[c0] + (0.03) *Fosfatidiletholamina dioctodecanoil*[c0] => (0.03) *Polímero de peptideoglicana (n-1 subunidades)* [c0] + (40) $Fosfato[c0]$ + (40) $H^+[c0]$ + (0.48) $PPi[c0]$ + (40) $ADP[c0]$ + *Biomassa*[c0]

2) Síntese de ATP: $ADP[c0]$ + $Fosfato [c0]$ + (4) $H^+[e0]$ <=> $H_2O[c0]$ + $ATP[c0]$ + (3) $H^+[c0]$

As simulações não resultaram em valores objetivos diferentes para o potencial de produção de biomassa com diferentes fontes de carbono. No caso da produção de ATP, o meio padrão e autotrófico teve um potencial inferior 380,3 mmol de ATP/mmol de substrato contra 455,56 mmol de ATP/mmol de substrato dos meios com respectivamente, acetato e succinato como fontes únicas de carbono (Figura 7).

Com a adição dos elementos auxotróficos, todos os valores sofreram aumento. Em relação aos valores objetivo para produção de biomassa, os meios com fontes únicas de carbono apresentaram valor objetivo mais elevado em relação aos demais (Figura 7). A adição de elementos auxotróficos elevou a atividade da ATPase para um valor constante para todas as condições de 494,44 mmol de ATP/mmol de substrato (Figura 7).

5.2. Crescimento celular em diferentes condições

As células de *Mf. australis* cepa IT-1 foram cultivadas em meio semissólido e o homogeneizado do crescimento celular foi utilizado para as análises de crescimento celular. A correlação entre a densidade ótica a 600 nm e a contagem de células por microscopia ótica de fluorescência obteve um R^2 de 0,906 (Figura 8), e foi utilizado para a construção das curvas de crescimento.

Correlação entre o número de células de *Mf. australis* cepa IT-1 e desidade óptica do meio

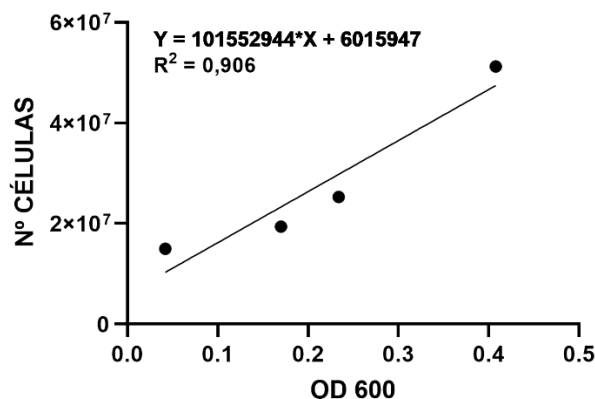


Figura 8. Regressão linear entre o número de células e a densidade ótica da suspensão de células de *Mf. australis* cepa IT-1 ($P < 0,05$).

O efeito da alteração de forma qualitativa das fontes de carbono na composição do meio de cultivo da *Mf. Australis* cepa IT-1 afetou diretamente a velocidade de crescimento e o potencial de geração de biomassa dentro do tempo avaliado. O meio padrão, no qual duas fontes de heterotróficas de carbono e uma autotrófica estão presentes, apresentou maior velocidade de crescimento e maior potencial de geração de biomassa após 48 horas de crescimento (Figura 9).

O meio acetato e succinato apresentaram efeito similar sobre a velocidade de crescimento da célula, no entanto em 48 ($P = 0,0005$) e 56 horas ($P = 0,0010$) o meio acetato apresentou maior geração de biomassa (Figura 9). No caso do efeito sobre o crescimento celular, da adição do extrato de levedura ao meio padrão. A velocidade inicial de crescimento foi superior com a adição de extrato de levedura ($P = 0,003$), no entanto, a geração de biomassa se manteve similar a partir das 24 horas de crescimento (Figura 9).

Curvas de crescimento da *Magnetofaba australis* cepa IT-1 em diferentes condições de cultivos

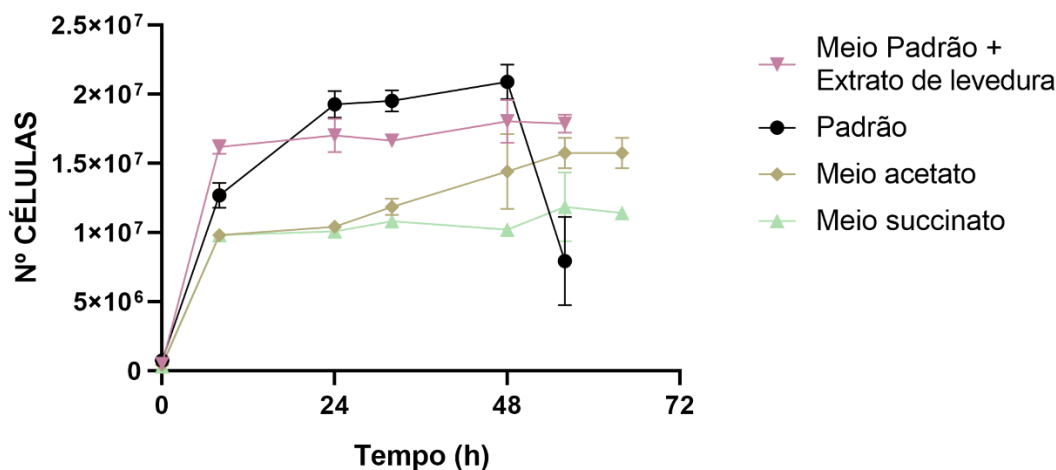


Figura 9. Curva de crescimento da *Magnetofaba australis* cepa IT-1 crescendo no meio padrão, com diferentes fontes únicas de carbono (acetato ou succinato) e no meio padrão com adição de extrato de levedura. Diferença estatística feita a partir de comparação múltipla de tukey com significância para $P < 0,05$

O efeito da alteração de forma qualitativa das fontes de carbono na composição do meio de cultivo da *Mf. Australis* cepa IT-1 afetou diretamente a velocidade de crescimento e o potencial de geração de biomassa dentro do tempo avaliado. O meio padrão, onde duas fontes de heterotróficas de carbono e uma autotrófica estão presentes, apresentou maior velocidade de crescimento e maior potencial de geração de biomassa após 48 horas de crescimento (Figura 9).

O meio acetato e succinato apresentaram efeito similar sobre a velocidade de crescimento da célula, no entanto em 48 ($P = 0,0005$) e 56 horas ($P = 0,0010$) o meio acetato apresentou maior geração de biomassa (Figura 9). No caso do efeito sobre o crescimento celular, da adição do extrato de levedura ao meio padrão. A velocidade inicial de crescimento foi superior com a adição de extrato de levedura ($P = 0,003$), no entanto, a geração de biomassa se manteve similar a partir das 24 horas de crescimento (Figura 9).

5.2.1. Adição e remoção de ferro e componentes traço

O cultivo de *M.f. australis* cepa IT-1 e quantificação do número de célula por citometria de fluxo após 48 horas de cultivo na ausência de vitaminas e ferro indicou uma redução significativa de 45,47% e 51% respectivamente (Figura 10). Os meios com adição

dos componentes auxotróficos em detrimento da solução de vitaminas apresaram aumento significativo no número de células em relação ao meio sem vitaminas, o mesmo foi observado para a adição do extrato de levedura. Acerca do meio padrão, o aumento no número de células foi significante quando comparada a adição de componentes auxotróficos (aumento de 20,6%) mas não teve diferença significativa quando comparado ao meio com extrato de levedura (Figura 10).

Efeito de componentes traço e da fonte de ferro

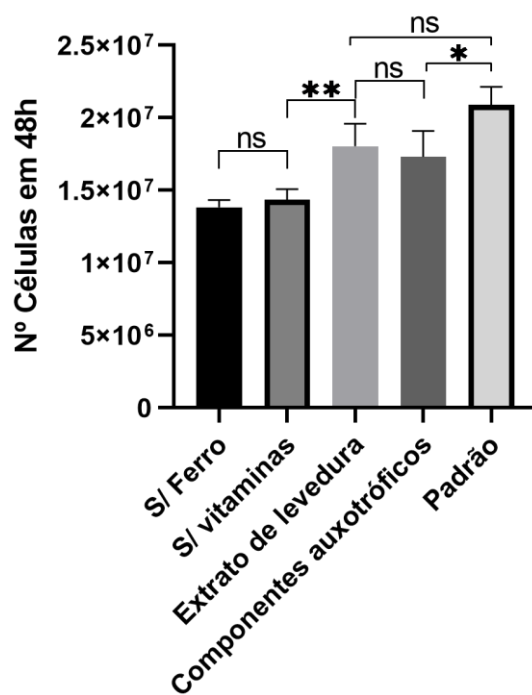


Figura 10. Efeito da remoção de vitamina e de ferro e da adição de extrato de levedura e dos componentes auxotróficos no número de células de *Mf. australis* cepa IT-1 após 48 horas de crescimento comparado ao meio padrão. Diferenças estatísticas avaliadas pelo teste de Tukey com alfa de 0,05.

5.3. Produção de NMOBs em diferentes condições

A partir de imagens de microscopia eletrônica de transmissão das células de *Mf. australis* cepa IT-1 (Figura 11), foi feita a contagem do número de NMOBs em cada célula e os dados foram compilados na figura 12.

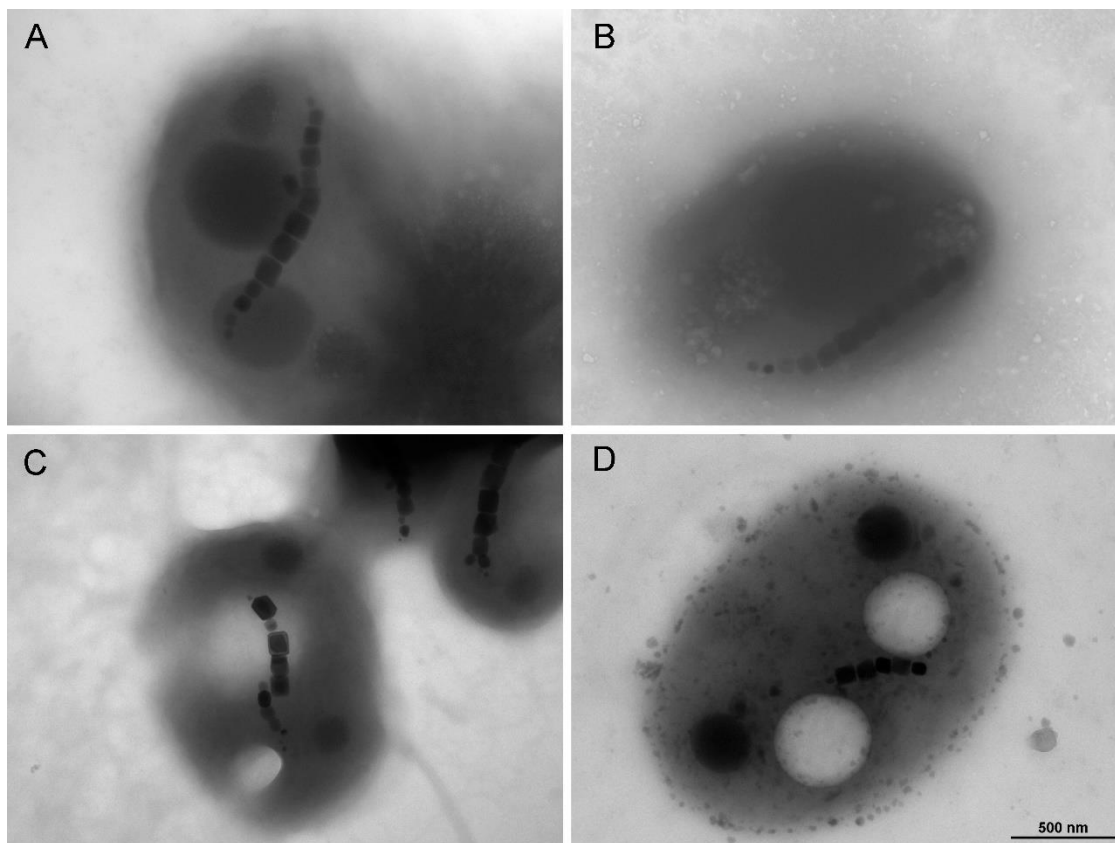


Figura 11. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de *Mf. australis* cepa IT-1 1 crescendo no meio padrão (A), em meios com fontes únicas de carbono sendo ela, Acetato (B) e Succinato (C) e meio padrão com a adição de extrato de levedura (D)

O número médio de NMOBs por célula foi de $9,5 \pm 2,7$; $10,5 \pm 2,8$; $7,7 \pm 6,0$ para o meio padrão, meio acetato e meio succinato respectivamente (Figura 12). É possível afirmar então, que a alteração nas fontes de carbono não teve efeito significativo sobre a média de NMOBs por célula. No caso da adição de extrato de levedura ao meio padrão, a média de NMOBs por célula foi de $6,2 \pm 2,3$, portanto, teve um efeito negativo sobre a produção de NMOBs (Figura 12).

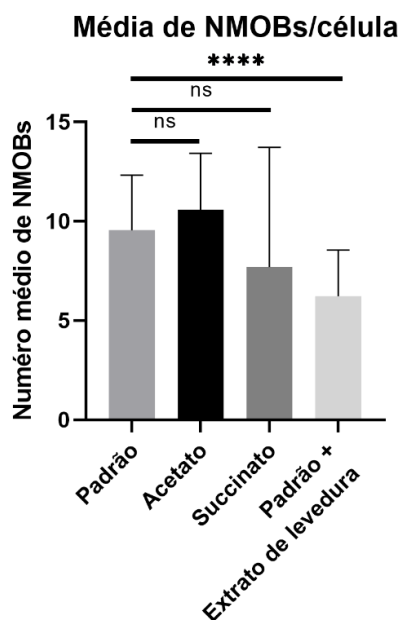


Figura 12. Avaliação do número de NMOBs por célula de *Mf. Australis* cepa IT-1 crescendo no meio padrão (n = 31), em meios com fontes únicas de carbono sendo ela, Acetato (n = 16) e Succinato (n = 36) e meio padrão com a adição de extrato de levedura (n = 35). As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t não pareado com significância para $P < 0,05$.

5.4. Rendimento

O rendimento de NMOBs foi dado pela multiplicação da média de número de células em 48 horas de crescimento pela média do número de NMOBs/célula, o desvio foi obtido pela multiplicação do desvio do número de NMOBs/célula pela média do número de células. O maior rendimento foi obtido com o meio padrão ($1,99 \times 10^8 \pm 5,78 \times 10^7$), seguido pelo meio acetato ($1,52 \times 10^8 \pm 4,11 \times 10^7$), meio succinato ($7,85 \times 10^7 \pm 6,14 \times 10^7$) e, por fim, o padrão com extrato de levedura ($1,12 \times 10^8 \pm 4,17 \times 10^7$) (Figura 13).

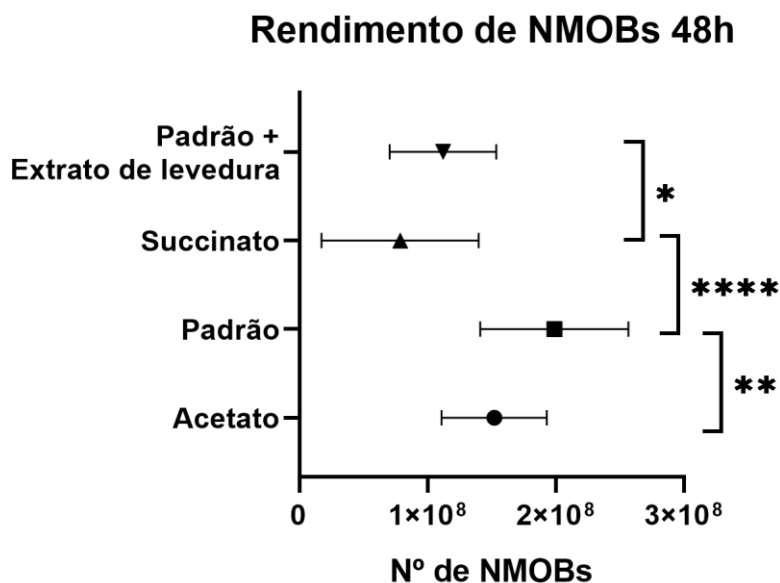


Figura 13. Rendimento médio e desvio padrão da produção de NMOBs e massa de magnetita produzida para *Mf. australis* cepa IT-1 após 48 horas de crescimento crescendo em meio padrão, com Succinato ou acetato como diferentes fontes únicas de carbono e em meio padrão com a adição de extrato de levedura. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t não pareado com significância para $P < 0,05$.

5.5. Produção de grânulos

O genoma de *Mf. Australis* apresenta genes envolvidos tanto na redução de sulfato, sulfato adeniltransferase e adenilsulfato kinase, como envolvidos na síntese de polifosfato, polifosfato quinase e exopolifosfatase (ARAÚJO *et al.*, 2016). A metodologia utilizada para a medição das áreas de grânulos não foi capaz de distinguir entre a composição dos grânulos. Nas medições realizadas não houve diferença significativa na área de grânulos produzidos pelas células nas condições avaliadas (Figura 14).

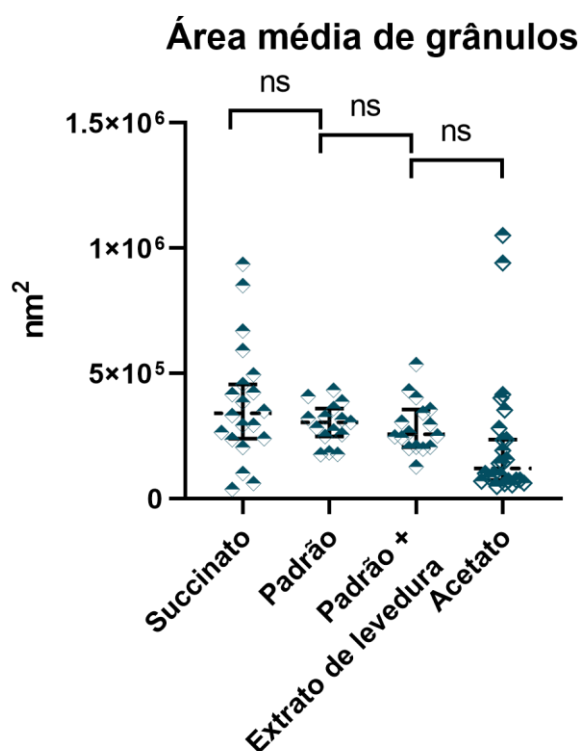


Figura 14. Média de área por célula composta por grânulos em *Mf. australis* cepa IT-1, mensurado a partir de imagens de MET, avaliado em meio utilizando succinato (n = 20) ou acetato (n = 24) como fonte única de carbono no meio padrão (n = 15) e no meio padrão com adição de extrato de levedura (n = 16).

5.6. Custo do meio

Avaliar os custos materiais envolvidos no meio de cultivo pode estabelecer um parâmetro para avaliara a relação custo/benefício no processo de otimização do meio de cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1. Com a discriminação do custo de produção por litro do meio líquido podemos identificar o HEPES e a solução de vitaminas contribuindo com 54.1% do custo total de produção do meio de cultivo. A água do mar artificial (ASW) e a solução de sulfato ferroso também apresentam grande contribuição na composição final do meio, 33,8% (Tabela 4).

Tabela 4. Discriminação dos custos por litro dos componentes do meio líquido de cultura de *Mf. australis* cepa IT-1.

Reagente	Quantidade	Custo	Custo final	% do custo
				total
ASW	1000 ml	R\$ 7,99/L	R\$ 7,99	19.4%
HEPES	2.4 g	R\$ 4580/kg	R\$ 10,99	26.7%
Cloreto de amônia	0.3 g	R\$ 597/kg	R\$ 0,18	0.4%
Acetato de sódio	1 g	R\$ 737/kg	R\$ 0,74	1.8%

Succinato de sódio	1 g	R\$ 974/kg	R\$ 0,97	2.4%
Minerais de Wolfe	5000 µl	R\$ 5,57/L	R\$ 0,28	0.7%
Bicarbonato de sódio	1.2 g	R\$ 268/Kg	R\$ 0,32	0.8%
L-cisteína	0.2 g	R\$ 8740/Kg	R\$ 1,75	4.2%
K ₂ HPO ₄ a 1,86%	1500 µl	R\$ 1262/kg	R\$ 0,35	0.9%
FeSO ₄ a 10mM	3000 µl	R\$ 1304/kg	R\$ 5,95	14.4%
Solução de vitaminas	500 µl	R\$ 22,6/Kg	R\$ 11,30	27.4%
Tiosulfato de sódio a 40%	3000 µl	R\$ 339,2/kg	R\$ 0,41	1.0%
TOTAL:			R\$ 41,23	

5.7. Efeito da variação das concentrações

A partir da formulação do meio de cultivo semissólido para bactérias magnetotáticas com gradiente de oxigênio (Tabela 1), foi feito 8 ensaios variando os níveis dos 7 componentes a fim de avaliar a contribuição dos componentes sobre o crescimento celular (Tabela 5). A rezasurina foi omitida da otimização por não ter efeito prático sobre o crescimento celular, a razões C/N foram estabelecidas considerando mantendo a proporção original das fontes de carbono no meio padrão (Tabela 5). O HEPES não foi considerado na otimização do meio por ter função de tamponamento, sua retirada não foi considerada, pois o metabolismo de *Mf. australis* cepa IT-1 tende a acidificar o meio sem tamponamento (Tabela 5).

Tabela 5. Matriz de 8 experimentos para avaliação do efeito de 7 componentes do meio de cultivo, elas sendo razão Carbono/nitrogênio (X1), solução de minerais (X2), cisteína 3% (X3), Quinato férrico (X4), solução de vitaminas (X5), Tiosulfato de sódio (X6) e fosfato dipotássico (X7).

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
1	6,77	0,1%	0,975%	5 mM	0,1%	0,18%	0,341 mM
2	20,32	0,1%	0,325%	5 mM	0	0,18%	5,367 mM
3	6,77	2,5%	0,325%	5 mM	0,1%	0,02%	5,367 mM
4	20,32	2,5%	0,975%	5 mM	0	0,02%	0,341 mM
5	6,77	0,1%	0,975%	35 mM	0	0,02%	5,367 mM
6	20,32	0,1%	0,325%	35 mM	0,1%	0,02%	0,341 mM
7	6,77	2,5%	0,325%	35 mM	0	0,18%	0,341 mM
8	20,32	2,5%	0,975%	35 mM	0,1%	0,18%	5,367 mM

A partir da variação no crescimento celular entre os meios avaliados, percebe-se que as maiores contribuições advindas do efeito da razão carbono/nitrogênio do quinato férrico e da cisteína tiveram as maiores contribuições no aumento no crescimento celular (Figura 16). O efeito do tiosulfato (2,22%), da solução de minerais (0,3%) e do fosfato dipotássico (0,95%) apresentaram valor de $p > 0,05$ nas estatísticas de ANOVA e definidos como não significante.

Número de células em 48h com variação dos níveis de cada componente

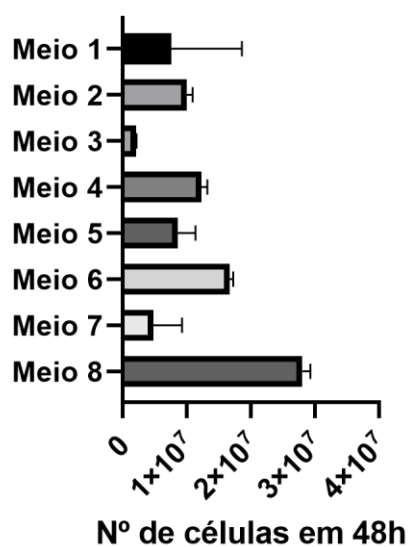


Figura 15. Número de células de *Mf. australis* após 48h de crescimento nos 8 meios estabelecidos a partir da variância dos componentes do meio padrão.

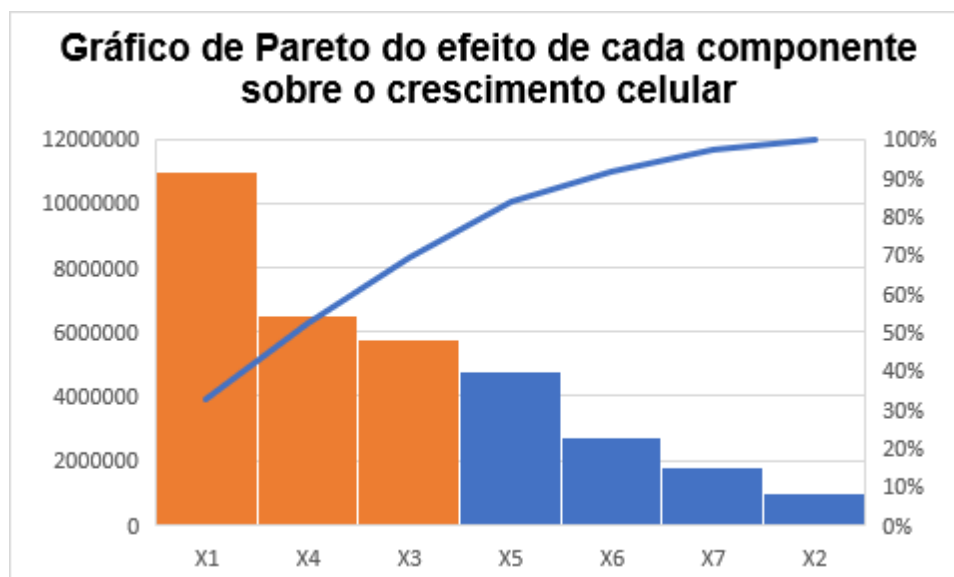


Figura 16. Gráfico de Pareto da contribuição de cada componente para o crescimento celular de *Mf. australis* cepa IT-1. As barras em laranja indicam os componentes responsáveis por cerca de 80% do efeito.

6. Discussão

6.1. Cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 e construção das curvas de crescimento

Os experimentos realizados durante a execução desse projeto foram feitos utilizando apenas o cultivo em meio semissólido, ao invés do meio líquido mais comumente utilizado em estudo de bioprocessos. O metabolismo da bactéria em questão demanda concentrações restritas de oxigênio (20 – 40 μM) que dificilmente poderiam ser padronizadas no cultivo em frasco, afetando a reprodutibilidade dos experimentos. Até então, nenhum protocolo para cultivos coccus magnéticos em meio sólido foi estabelecido, limitando as abordagens disponíveis.

O meio semissólido permite a formação de gradiente de oxigênio e permite que as células se estabeleçam na altura em que a concentração de oxigênio é ideal para seu metabolismo. Outros estudos onde o gradiente de oxigênio ou de outros compostos oxidados ou reduzidos seriam importantes se utilizaram do meio semissólido, como para estudar o efeito de diferentes compostos orgânicos na produção de biomassa de *Beggiatoa* (Hagen e Nelson, 1996). Assim, para essa etapa da otimização do cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 o meio de cultivo semissólido foi utilizado, e para a padronização dos experimentos o volume de ar no *headspace* e altura do inóculo foi padronizada.

6.2. Efeito da troca de fontes de carbono e de componentes traço

As funções objetivas definidas para as análises *in silico* tiveram dois principais objetivos. Analisar o efeito das diferentes fontes de carbono e do efeito dos componentes tidos como auxotróficos de acordo com o modelo metabólico no crescimento celular. Em seguida, tentar estimar o efeito das mesmas condições na produção de NMOBs pelas células, correlacionando essa característica com a produção de ATP, consequentemente guiando os experimentos de bancada. Os dados das simulações foram confrontados com os resultados dos experimentos de bancada, que forneceram dados para análise de rendimento de NMOBs e velocidade de crescimento celular.

Diversos estudos se utilizam de simulações de crescimento celular para complementar experimentos de bancada, no entanto, as simulações podem descrever condições irrealistas para condições celulares (Ford et al., 2022). O software utilizado nesse trabalho se baseia na relação estequiométrica entre a quantidade de matéria inserida no sistema e seu consumo para atingir a função objetiva no menor número de reações, assumindo um estado metabólico contante. No contexto da troca de fontes de carbono, a diferença nos valores objetivos vai estar relacionado a diferença no número de reações entre a captação do substrato e o objetivo final (Orth, Thiele e Palsson, 2010). Essa abordagem, pode apresentar limitações pois não leva em consideração variações nos níveis de expressão de genes e não é capaz de prever acúmulo de substâncias.

6.2.1. Crescimento celular

Inicialmente, os dados relacionados a redução das múltiplas fontes de carbono do meio padrão (bicarbonato de sódio, acetato e succinato), apenas acetato ou apenas succinato foram confrontados. As análises de balanço de fluxo não indicaram diferença na produção de biomassa entre as condições sem componentes auxotróficos (Figura 7), no entanto, as curvas de crescimento indicam uma redução na velocidade de crescimento e na geração de biomassa dentro do tempo estabelecido em relação as mudanças no meio padrão para ambos (Figura 9). Entre as fontes únicas de carbono, as velocidades iniciais de crescimento se equipararam entre si, mas o meio com acetato teve maior número de células a partir de 48h.

A adição dos componentes auxotróficos nas simulações induziu o aumento no valor objetivo em todos os casos, além de igualar a produção de ATP entre as condições

avaliadas. Nos experimentos de bancada, foi avaliado o crescimento celular com a adição dos componentes auxotróficos e com a adição de extrato de levedura. Em 48 horas de crescimento, a substituição da solução de vitaminas pelas componentes auxotróficas não resultou em maior número de células em relação ao meio padrão (Figura 10), no entanto o crescimento foi significativamente superior ao meio na ausência de vitaminas.

A adição de extrato de levedura foi avaliada por ser um componente barato para a suplementação dos componentes auxotróficos e adição de diversos aminoácidos diretamente no meio. Não foi observado diferença significativa no número de células após 48 horas de cultivo em relação ao meio padrão (Figura 10), no entanto, a velocidade de crescimento com a adição de extrato de levedura foi superior (Figura 9). Esse encurtamento da fase lag pode ter sido efeito da adição de aminoácidos e uma consequente aceleração na síntese de proteínas, fenômeno já observado em outros trabalhos (Azubuike et al., 2020). Como observado pelo planejamento experimental, a adição de carbono e nitrogênio no meio de cultivo tem efeito significativo no crescimento celular, a velocidade inicial de crescimento pode ter tido influência da maior disponibilidade desses elementos após a adição de extrato de levedura.

No modelo metabólico, as reações onde os componentes auxotróficos estão envolvidos podem levar a maior velocidade de crescimento. Algumas rotas que podem ter sido importantes são:

“L-serina ammonia-liase: L-Serina \Rightarrow NH₃ + Piruvato”, que pode ser uma via direta para produção de piruvato e acelerar o metabolismo energético, nas simulações relativa à atividade da ATPase pode ter sido a via metabólica preferencial no metabolismo energético, assim estabilizando o valor objetivo para todas as condições em que L-serina estava presente.

Participação da L-serina no metabolismo de lipídeos pela ação da Glycerophosphodiester phosphodiesterase.

Participação da L-metionina na síntese de biotina, que atua como cofator para reações de carboxilação, decarboxilação e transcarboxilação (Hebbeln *et al.*, 2007).

Comparado a outros estudos de otimização de formulação de meios de cultivo, o crescimento de *Mf. australis* cepa IT-1 se destaca quanto a velocidade inicial de crescimento, que cresce exponencialmente já nas primeiras 8 horas de cultivo. Na curva de

crescimento descrita para *Mv. blakemorei* cepa MV-1 crescendo no meio otimizado em biorreator de 5 litros (Silva et al., 2012), no entanto, uma fase lag mais reduzida foi descrita no desenvolvimento de batelada alimentada também para MV-1 (Correa et al., 2022). Já em bioprocessos focados em *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 observamos o início da fase exponencial após 10 horas de crescimento (Zhang et al., 2011).

6.2.2. Rendimento de NMOBs

Em trabalhos publicados, foi observada a correlação entre a maior captação de ferro e a atividade de ATPase citoplasmática em *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1, graças a amplificação da atividade dos transportadores de ferro ferroso da família *feoAB* (Suzuki et al., 2007). No entanto, as análises de balanço de fluxo quanto a produção de ATP, apesar de terem indicado maior produção nos meios com uma única fonte de carbono (Figura 7), os dados experimentais não indicaram diferença significativa na produção de NMOBs/célula, apesar de transportadores da família *feoAB* também estarem presentes em IT-1 (Figura 12).

O rendimento final de NMOBs após 48 horas de cultivo foi maior com o meio padrão, seguido pelo meio acetato, meio padrão com extrato de levedura e meio succinato. O meio padrão teve rendimento médio 23,6% superior ao meio acetato, a diferença dos custos de reagentes de 3,2% também justifica a continuidade do uso do meio padrão em um bioprocessos para a produção de NMOBs de *Mf. australis* cepa IT-1. A comparação dos rendimentos obtidos contra o rendimento do bioprocessos de outras MTB é limitada devido a diferenças na distribuição das células em meio líquido quando comparado semissólido, onde as células se concentram em entre 1 e 2 ml do volume.

6.2.3. Produção de grânulos

A produção de grânulos pela *Mf. australis* cepa IT-1 não foi afetada pela troca nas fontes de carbono nem pela adição de extrato de levedura. Sun et al. 2023, avaliou o efeito de diferentes regimes de cultivo variando entre condições óxicas ($5.1 \pm 1.2 \mu\text{M O}_2$) e anóxicas ($> 0.0052 \mu\text{M}$) sobre a formação de inclusões intracelulares de *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (NMOBs, PHA e polifosfato) e indicou que no geral as condições óxicas favoreceram a formação desses tipos de inclusão. O mesmo estudo, ao submeter as células por ciclos óxicos e anóxicos intercalados demonstrou a degradação ativa de polifosfato

durante períodos anóxicos, onde possivelmente o grânulo serviu para a produção de ATP (Sun et al., 2023).

O mesmo padrão de produção de polifosfato em condições óxicas e degradação em anoxia também foi observado em MTB a família *Magnetococcaceae* (Schulz-Vogt et al., 2019). No gradiente de oxigênio, a *Mf. australis* cepa IT-1 se estabelece na zona por volta de $9.4 \pm 1.5 \mu\text{M O}_2$ (Morillo et al., 2014), o que de acordo com os estudos mencionados anteriormente favorece a formação de grânulos, no entanto, a degradação de polifosfato em condições de anoxia não foram observadas para *Mf. australis* cepa IT-1. No entanto, exopolifosfatase e endopolifosfatase estão codificados no genoma.

As espécies de MTB mais exploradas atualmente, *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e *Ms. griphyswaldense* cepa MSR-1 acumulam um baixo conteúdo de fosfato e nunca foram foco de projetos relacionados a remoção biológica aprimorada de fósforo. No entanto, diversos coccus magnéticos capazes de acumular altos conteúdos de fósforo já foram observados na natureza, mas que não são explorados biotecnologicamente. A *Mf. australis* cepa IT-1, é capaz de acumular um conteúdo de fosfato cerca de 2000% maior que *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (Sun et al., 2023), tendo potencial para ser utilizado para recuperação de fosfato.

6.3. Efeito da variação da concentração dos componentes sobre o crescimento celular

Os componentes com maiores contribuições sobre o número de células de *Mf. australis* cepa IT-1, indicou que a razão C/N, volume de cisteína 3% e a concentração de quinato férrico como os componentes mais importantes sobre a resposta. Em termos de composição de biomassa, o carbono e nitrogênio são os elementos mais abundantes, consequentemente esses elementos em maior quantidade e em uma forma adequada para utilização pelo microrganismo favorece o crescimento celular.

A adição das formas de carbono na forma de acetato de sódio e succinato de sódio também implicam na maior concentração de sais. Na MTB de água doce, *Magnetospirillum* já foi demonstrado o efeito da pressão osmótica sobre a maior velocidade de crescimento celular (Zhang, et al 2013). O mesmo mecanismo ainda não foi descrito em bactérias marinhas. No entanto, a contribuição de 35,59% do aumento da

concentração de carbono sobre o crescimento celular pode estar relacionada também a variação na pressão osmótica.

No meio de coccus magnéticos a cisteína exerce a função de agente redutor, comumente utilizado para a cultura de bactéria anaeróbias estritas gerando um ambiente com menor potencial redutor de oxigênio e proteger os microrganismos de danos oxidativos. No entanto, agentes redutores em altas concentrações podem ter efeitos deletérios ao crescimento celular, assim mais estudos devem ser realizados para a definição dos níveis desse componente a serem utilizados para um planejamento de otimização (Takumi and Nonaka *et al.*, 2016).

No cultivo de bactérias magnetotáticas, já foi demonstrado que a diminuição da PRO pela adição de agentes redutores no cultivo de *Ms. magneticum* AMB-1 de -250 mV para -500 mV resultou no aumento de 10,9% da densidade ótica no meio dentro do mesmo período, além de elevar o número as NMOBs/célula e o tamanho das NMOBs (Widdrat *et al.*, 2019). O contrário foi observado na otimização de *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, em que a adição de cisteína não apresentou efeito sobre o crescimento celular e a produção de NMOBs. Dessa forma, a cisteína o foi mantida em níveis mínimos para garantir condições anaeróbias (Silva *et al.*, 2012).

O efeito positivo sobre o crescimento celular da adição de cisteína pode estar relacionado a maior resistência a oxidação durante a primeiras etapas do crescimento celular no meio de cultura semissólido com gradiente de oxigênio. Nos primeiros momentos após a inóculo, as células se locomovem ao longo do gradiente a fim de encontrar a região onde a concentração de oxigênio é ótima para o metabolismo energético, é possível que com maiores concentrações de cisteína, as células sofram menos danos oxidativos até ao se estabelecerem na região ótima. A cisteína pode também exercer a função de fonte de enxofre, o que pode também ter contribuído com o efeito positivo do componente.

No cultivo de bactérias magnetotáticas, a concentração e o estado químico do ferro são fatores comumente estudados para bioprocessos de MTB. Frequentemente, em estudos utilizando MTB do gênero *Magnetospirillum*, é descrito uma correlação entre a concentração de ferro e a maior produção de NMOBs/célula, quanto ao crescimento celular é descrito um efeito negativo em altas concentrações (Fernández-Castané *et al.*, 2018;

Zhang et al., 2011). Para *Mf. australis* cepa IT-1 foi observado uma correlação positiva entre o crescimento celular e concentração de quinato férrico. Essa correlação já foi descrita em *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que oxida ferro ferroso (Fe^{2+}) para férrico (Fe^{3+}) como parte do seu metabolismo energético (Yan et al., 2016).

No cultivo de *Mf. australis*, ocorre a adição de Fe^{3+} em um ambiente redutor gerado pela cisteína que pode favorecer a formação de Fe^{2+} e que poderia ser oxidado pela célula como parte do metabolismo energético. Outra explicação para o fenômeno pode ser advinda da presença das duas formas do ferro, uma vez que a formação da magnetita depende da proporção entre Fe^{3+} e Fe^{2+} de 2/1, isso pode representar uma economia de energia na formação de NMOBs (Olszewska-Widdrat et al., 2019).

No metabolismo de *Mf. australis* cepa IT-1, o tiosulfato de sódio está relacionado ao metabolismo autotrófico, ao exercer a função de doador de elétrons no Ciclo de Krebs reverso. Porém a variação da sua concentração teve efeito menos significativo sobre o crescimento celular, é possível então que o crescimento celular nas primeiras 48 horas foi predominantemente heterotrófico. O fosfato dipotássico que atua como fonte de fósforo e acceptor de elétrons, apesar de não ter tido pouco efeito sobre o número de células, ainda é essencial para o crescimento celular.

A variação no volume adicionado da solução de vitaminas resultou em um efeito discreto sobre a resposta. Apesar de a célula ser capaz de crescer na ausência de vitaminas (Figura 10), o crescimento é mais rápido quando estão presentes na formulação do meio sem afetar o crescimento celular (Figura 9), resultado que diverge com o estudo de otimização da *Mv. blakemorei* cepa MV-1^T, no qual as vitaminas não tiveram efeito significativo. Em termos econômicos, a remoção da solução de vitaminas representa uma redução do custo de produção de 27,4%, com uma perda de 45,47% de produção de biomassa, assim, ainda se justifica a utilização das vitaminas. Quanto a solução de minerais, o contrário foi observado para a cepa MV-1^T, sendo que o mesmo componente esteve entre os efeitos mais significantes, para *Mf. australis* cepa IT-1 os resultados indicaram a possibilidade de redução da concentração de minerais no meio de cultivo.

7. Conclusão

A tentativa de partir de uma abordagem *in silico* para otimização do meio de cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 não demonstrou boa previsibilidade quanto a avaliação do

crescimento de acordo com a mudanças nas condições de cultivo. No entanto, a caracterização do modelo revelou componentes auxotróficos que podem ter agido de forma a acelerar o crescimento celular, mas reduzindo a média de NMOBs/célula, foi demonstrado também que o extrato de levedura pode servir de fonte para esses componentes.

A avaliação da remoção das fontes de carbono estabeleceu o meio padrão com fontes autotrófica e heterotróficas como o maior potencial para bioprocessos, por ter maior velocidade de crescimento e maior rendimento de NMOBs. Quanto a adição de componentes traço, a solução de vitaminas se provou a mais importante e a otimização da sua formulação pode ser importante para também otimizar o aspecto econômico do cultivo.

A produção de grânulos em *Mf. australis* cepa IT-1 independe da qualidade da fonte de carbono e não sofreu interferência da adição de extrato de levedura. O maior acúmulo de fósforo em relação a demais MTBs mantidas em cultura pode ser uma oportunidade para investigar o potencial dessa célula para remoção biológica aprimorada de fosfato. Entretanto, as condições ambientais que levam a produção e degradação dos grânulos de polifosfato ainda precisam ser mais bem descritos para a célula.

Em conclusão os resultados indicam que a razão C/N, quinato férrico e cisteína são candidatos a terem seus níveis otimizados em um posterior planejamento estatístico que preze otimizar o crescimento celular. A solução de vitaminas teve efeito significativo, mas seu nível pode ser mantido no nível padrão. O tiossulfato de sódio, o fosfato dipotássico e a solução de minerais tiveram pouco efeito e podem, por tanto, serem mantidos em níveis mínimos. Os experimentos realizados ainda não avaliou o efeito de cada um dos fatores sobre a produção de NMOB, conseqüentemente não temos informação sobre o rendimento, que será o objetivo de trabalhos posteriores.

O potencial das NMOBs extraídos de *Mf. australis* cepa IT-1 e como ele se compara com NMOBs de espécies mais utilizadas são estudos que podem ser facilitados a partir da otimização do cultivo da célula. A caracterização das proteínas de superfícies e investigação dos seus aspectos funcionais são pesquisas que podem ser acarretadas no futuro não só com viés biotecnológico, mas também para o melhor entendimento da bioquímica relacionada a formação de NMOBs em *Magnetococcaceae*.

8. Produção científica e tecnológica

8.1. Artigo de revisão “Large-Scale Cultivation of Magnetotactic Bacteria and the Optimism for Sustainable and Cheap Approaches in Nanotechnology”

O artigo de revisão (Anexo 4), publicado em janeiro de 2023, se propôs a traçar um panorama dos estudos que tiveram como objetivo a desenvolver estratégias de cultivo em biorreator para a produção de NMOBs. Além de compilar e discutir os diferentes métodos de funcionalização de NMOBs e suas aplicações com foco no campo biomédico. Por fim, foi analisado a presença de NMOBs em registro de propriedade intelectual por classificação técnica.

O trabalho aqui descrito se relaciona com a publicação na medida em que se propõe a estudar com um viés de bioprocessos as condições de cultivo de uma espécie pouco estudada, porém com potencial para aplicações baseadas na utilização da célula quanto como espécie em potencial para a produção de NMOBs em larga escala para sustentar aplicações sendo desenvolvidas.

8.2. Patente depositada sobre número de registro BR1020220243573

A invenção, ainda com título sob sigilo, consiste na aplicação de NMOBs de diferentes espécies de MTB, incluindo a *Mf. australis* cepa IT-1.

9. Referências

ABREU, F.; ACOSTA-AVALOS, D. Biology and Physics of Magnetotactic Bacteria. **IntechOpen**, v. i, n. Microorganisms, p. 13, 2018.

AHN, T. *et al.* Formation pathways of magnetite nanoparticles by coprecipitation method. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 10, p. 6069–6076, 15 mar. 2012.

ALI, A. *et al.* **Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications** **Frontiers in Chemistry** Frontiers Media S.A., , 13 jul. 2021a.

ARAKAKI, A. *et al.* **Cadmium Recovery by a Sulfate-Reducing Magnetotactic Bacterium, Desulfovibrio magneticus RS-1, Using Magnetic Separation.** [s.l: s.n.].

ARAUJO, A. C. V. *et al.* Combined genomic and structural analyses of a cultured magnetotactic bacterium reveals its niche adaptation to a dynamic environment. **BMC Genomics**, v. 17, 25 out. 2016.

BAZYLINSKI, D. A. *et al.* 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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART3, p. 801–808, 2013.

BUCHHOLZ, K.; COLLINS, J. **The roots - A short history of industrial microbiology and biotechnology** *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer Verlag, , 1 maio 2013.

CABRAL, A. S. *et al.* Virioplankton dynamics are related to eutrophication levels in a tropical urbanized bay. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2017.

CHENG, L. *et al.* Co-delivery of doxorubicin and recombinant plasmid pHSP70-Plk1-shRNA by bacterial magnetosomes for osteosarcoma therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 5277–5286, 1 jan. 2016.

CHMYKHALO, V. *et al.* **Microbial-based magnetic nanoparticles production: A mini-review** *Integrative Biology* Oxford University Press, , 1 abr. 2021.

CORREA, T. *et al.* A rapid and simple preparation of amphotericin B-loaded bacterial magnetite nanoparticles. **RSC Advances**, v. 11, n. 45, p. 28000–28007, 2021.

CORREA, T.; ABREU, F. Antarctic microorganisms as sources of biotechnological products. **Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles**, n. i, p. 269–284, 2020.

CORREA, T. N. *et al.* Biomineralization of Magnetosomes: Billion-Year Evolution Shaping Modern Nanotools. **Biomineralization [Working Title]**, p. 1–21, 2020.

CORREA, T.; PRESCILIANO, R.; ABREU, F. Why Does Not Nanotechnology Go Green? Bioprocess Simulation and Economics for Bacterial-Origin Magnetite Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. August, p. 1–12, 2021.

DAI, Q. *et al.* Bacterial magnetosomes as an efficient gene delivery platform for cancer theranostics. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, 28 nov. 2017.

DIEUDONNÉ, A.; PRÉVÉRAL, S.; PIGNOL, D. A sensitive magnetic arsenite-specific biosensor hosted in magnetotactic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 14, 1 jul. 2020.

DIXON, R.; KAHN, D. **Genetic regulation of biological nitrogen fixation** *Nature Reviews Microbiology*, ago. 2004.

EFFENBERGER, F. B. *et al.* Economically attractive route for the preparation of high quality magnetic nanoparticles by the thermal decomposition of iron(III) acetylacetonate. **Nanotechnology**, v. 28, n. 11, 13 fev. 2017a.

FARAJI, M.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. **Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications**JOURNAL OF THE. [s.l: s.n.].

FATIMA, H.; CHARINPANITKUL, T.; KIM, K.-S. Fundamentals to Apply Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia Therapy. **Nanomaterials**, v. 11, n. 5, p. 1203, 2021.

FATIMAH, I.; FADILLAH, G.; YUDHA, S. P. **Synthesis of iron-based magnetic nanocomposites: A review**Arabian Journal of ChemistryElsevier B.V., , 1 ago. 2021.

GENG, Y. *et al.* Growth-inhibitory effects of anthracycline-loaded bacterial magnetosomes against hepatic cancer in vitro and in vivo. **Nanomedicine**, v. 14, n. 13, p. 1663–1680, 2019.

GOSWAMI, P. *et al.* **Magnetotactic bacteria and magnetofossils: ecology, evolution and environmental implications**npj Biofilms and MicrobiomesNature Research, , 1 dez. 2022.

HAFSI, M. *et al.* RGD-functionalized magnetosomes are efficient tumor radioenhancers for X-rays and protons. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 23, 1 jan. 2020.

HAMARAT ŞANLIER, Ş. *et al.* Development of Ultrasound-Triggered and Magnetic-Targeted Nanobubble System for Dual-Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 3, p. 1272–1283, 2019.

HASANY, S. F. *et al.* **Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Chemical Synthesis and Applications Review**. [s.l: s.n.].

HAYASHI, H.; HAKUTA, Y. **Hydrothermal Synthesis of metal oxide nanoparticles in supercritical water**Materials, 2010.

HEBBELN, P. *et al.* **Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/content/full/>.

HEYEN, U.; SCHÜLER, D. Growth and magnetosome formation by microaerophilic Magnetospirillum strains in an oxygen-controlled fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5–6, p. 536–544, 2003.

JEFREMOVAS, E. M. *et al.* Modifying the magnetic response of magnetotactic bacteria: incorporation of Gd and Tb ions into the magnetosome structure. **Nanoscale Advances**, v. 4, n. 12, p. 2649–2659, 26 abr. 2022.

JOSEP M. GASOL; GIORGIO, P. A. DEL. **Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities.** [s.l: s.n.].

KAWAGUCHI, R. *et al.* Phylogenetic analysis of a novel sulfate-reducing magnetic bacterium, RS-1, demonstrates its membership of the $\hat{\gamma}$ -Proteobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 126, n. 3, p. 277–282, mar. 1995.

KEIM, C. N. *et al.* Intracellular inclusions of uncultured magnetotactic bacteria. **INTERNATIONAL MICROBIOLOGY**, p. 111–117, 2005.

KNÖSPEL, F. *et al.* Optimization of a serum-free culture medium for mouse embryonic stem cells using design of experiments (DoE) methodology. **Cytotechnology**, v. 62, n. 6, p. 557–571, dez. 2010.

KOZIAEVA, V. *et al.* Genome-Based Metabolic Reconstruction of a Novel Uncultivated Freshwater Magnetotactic coccus “Ca. Magnetaquicoccus inordinatus” UR-1, and Proposal of a Candidate Family “Ca. Magnetaquicoccaceae”. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2 out. 2019.

KRAWCZYK-BÄRSCH, E. *et al.* Peptidoglycan as major binding motif for Uranium bioassociation on Magnetospirillum magneticum AMB-1 in contaminated waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 437, 5 set. 2022.

LEFÈVRE, C. T. *et al.* Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3740–3743, jun. 2010.

LEFÈVRE, C. T. Isolation of obligately alkaliphilic magnetotactic bacteria from extremely alkaline environments. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 2342–2350, ago. 2011.

LEFEVRE, C. T.; BAZYLINSKI, D. A. Ecology, Diversity, and Evolution of Magnetotactic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 497–526, 1 set. 2013.

LI, J. *et al.* Controlled cobalt doping in the spinel structure of magnetosome magnetite: New evidences from element- and site-specific X-ray magnetic circular dichroism analyses. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 13, n. 121, 1 ago. 2016.

LI, J. Biomineralization and Magnetism of Uncultured Magnetotactic Coccus Strain THC-1 With Non-chained Magnetosomal Magnetite Nanoparticles. **Journal of Geophysical Research: Solid Earth**, v. 125, n. 12, 2020.

LI, J.. Diverse Intracellular Inclusion Types Within Magnetotactic Bacteria: Implications for Biogeochemical Cycling in Aquatic Environments. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 126, n. 7, 1 jul. 2021.

LIN, W.; PAN, Y. A putative greigite-type magnetosome gene cluster from the candidate phylum Latescibacteria. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 2, p. 237–242, 1 abr. 2015.

LUCA, R. DE *et al.* Comparison of strategies for iterative model-based upstream bioprocess development with single and parallel reactor set-ups. **Biochemical Engineering Journal**, v. 191, p. 108813, fev. 2023.

MAKHATHINI, S. S. *et al.* pH-Responsive Micelles From an Oleic Acid Tail and Propionic Acid Heads Dendritic Amphiphile for the Delivery of Antibiotics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 8, p. 2594–2606, 2020.

MICKOLEIT, F. *et al.* Long-Term Stability, Biocompatibility, and Magnetization of Suspensions of Isolated Bacterial Magnetosomes. **Small**, 2023.

MICKOLEIT, F.; LANZLOTH, C.; SCHÜLER, D. A Versatile Toolkit for Controllable and Highly Selective Multifunctionalization of Bacterial Magnetic Nanoparticles. **Small**, v. 16, n. 16, 2020.

MICKOLEIT, F.; SCHÜLER, D. Generation of nanomagnetic biocomposites by genetic engineering of bacterial magnetosomes. **Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials**, v. 8, n. 1, p. 86–98, 2019.

MITTMANN, E. *et al.* A Magnetosome-Based Platform for Flow Biocatalysis. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 2022.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. [s.l.: s.n.]. v. 8^o edition

MORILLO, V. *et al.* Isolation, cultivation and genomic analysis of magnetosome biomineralization genes of a new genus of South-seeking magnetotactic cocci within the Alphaproteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. FEB, 2014.

NAN, X. *et al.* Biocompatibility of bacterial magnetosomes as mri contrast agent: A long-term in vivo follow-up study. **Nanomaterials**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2021.

OLSZEWSKA-WIDDRAT, A. *et al.* Reducing conditions favor magnetosome production in magnetospirillum magneticum AMB-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, 2019.

ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. O. **What is flux balance analysis?** *Nature Biotechnology*, mar. 2010.

PÉREZ-FERNÁNDEZ, B. A. *et al.* In-silico media optimization for continuous cultures using genome scale metabolic networks: The case of CHO-K1. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 5, p. 1884–1897, 1 maio 2021.

PORNATTANANANGKUL, D. *et al.* Bacterial toxin-triggered drug release from gold nanoparticle-stabilized liposomes for the treatment of bacterial infection. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 11, p. 4132–4139, 23 mar. 2011.

PROZOROV, T. *et al.* Manganese incorporation into the magnetosome magnetite: magnetic signature of doping. **European Journal of Mineralogy**, v. 26, n. 4, p. 457–471, 3 set. 2014.

RIVAS-LAMELO, S. *et al.* Magnetotactic bacteria as a new model for P sequestration in the ferruginous Lake Pavin. **Geochemical Perspectives Letters**, v. 5, p. 35–41, 2017a.

ROCKSTRÖM, J. *et al.* **Planetary Boundaries: Exploring the Safe Operating Space for Humanity**. [s.l.: s.n.].

SANDLE, T. **History and development of microbiological culture media**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.pharmig.blogspot.com>.

SATALKAR, P.; ELGER, B. S.; SHAW, D. M. Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter? **Science and Engineering Ethics**, v. 22, n. 5, p. 1255–1276, 1 out. 2016.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SHARMA, A. *et al.* Optimization of L-alanine production in the recombinant *Pediococcus acidilactici* BD16 (alaD+). **Biochemical Engineering Journal**, v. 177, 1 jan. 2022.

SILVA, K. T. *et al.* Optimization of magnetosome production and growth by the magnetotactic vibrio *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1 through a statistics-based experimental design. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2823–2827, abr. 2013.

SINGH, V. *et al.* **Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Research Foundation, , 6 jan. 2017.

STUART, M. A. C. *et al.* Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. **Nature Materials**, v. 9, n. 2, p. 101–113, 2010.

SU, Q.; BAZYLINSKI, D. A.; JENSEN, M. M. Effect of oxic and anoxic conditions on intracellular storage of polyhydroxyalkanoate and polyphosphate in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 15 jun. 2023.

SUN, J. B. *et al.* Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: Magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 6, p. 1313–1320, 2008.

SUZUKI, T. *et al.* Cytoplasmic ATPase involved in ferrous ion uptake from magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. **FEBS Letters**, v. 581, n. 18, p. 3443–3448, 24 jul. 2007.

TANG, Y. S. *et al.* Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of bacterial magnetosome–anti-4-1BB antibody complex: Bacterial magnetosome as antibody carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 290–297, 2019.

TENG, Z. *et al.* Diversity and characterization of multicellular magnetotactic prokaryotes from coral reef habitats of the paracel Islands, South China Sea. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, 11 set. 2018.

UEBE, R.; SCHÜLER, D. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 10, p. 621–637, 2016.

VARGAS, G. *et al.* Applications of magnetotactic bacteria, magnetosomes and magnetosome crystals in biotechnology and nanotechnology: mini-review. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 1–25, 2018a.

XU, J. *et al.* In vitro magnetosome remineralization for silver-magnetite hybrid magnetosome biosynthesis and used for healing of the infected wound. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, 1 dez. 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Semicontinuous culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 cells in an autofermentor by nutrient-balanced and isosmotic feeding strategies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5851–5856, 2011.

ZWIENER, T. *et al.* Identification and elimination of genomic regions irrelevant for magnetosome biosynthesis by large-scale deletion in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

10. Anexos

Anexo 1. Composição do meio semissólido de cultivo heterotrófico de bactérias magnetotáticas marinhas com gradiente de oxigênio e função de cada componente.

ASW	100 mL	Função
HEPES	0,3 g	Tamponamento
Cloreto de amônio	0,024 g	Fonte de nitrogênio
Acetato de sódio	0,1 g	Fonte de heterotrófica de carbono
Succinato de sódio	0,1 g	Fonte de heterotrófica de carbono
Rezasurina a 0,2%	20µl	Indicador de oxi-redução
Bacto Agar	0,15 g	Agente solidificante
Bicarbonato de sódio	0,128 g	Fonte autotrófica de carbono
L-cisteína 3%	650µl	Agente redutor
Quinato férrico a 0,01M	200 µl	Fonte de ferro
K ₂ HPO ₄ a 1,86%	400 µl	Fonte de fósforo, acceptor de elétrons e tamponamento
Tiosulfato de sódio a 40%	500 µl	Doador de elétron
Minerais de Wolfe	500 µl	Fonte de minerais traço
Solução de vitaminas	50 µl	Fonte de vitaminas

Anexo 2. Composição da água do mar artificial (ASW)

Componente	g/L
NaCl	16,43
MgCl ₂ .6H ₂ O	3,49
Na ₂ SO ₄	2,74
KCl	0,465
CaCl ₂	0,386

Anexo 3. Composição da solução de vitaminas utilizada para o cultivo meio semissólido de cultivo heterotrófico de bactérias magnetotáticas marinhas.

Componente	g/100ml
Tiamina	90
Inositol	40
DL pantonoato de cálcio	4
Ácido amino benzoico	5
Vitamina B12	5
Piridoxina	4
Niacina	4
Biotina	0,1
Ácido fólico	0,04

Anexo 4. Artigo de revisão parte da produção científica e tecnológica,
<https://doi.org/10.3390/md21020060>.