

IGOR NUNES TAVEIRA

**EVOLUÇÃO DA MAGNETOTAXIA: PREDIÇÃO,
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTERIÓFAGOS POTENCIALMENTE TRANSDUTORES
DE GENES DE BIOMINERALIZAÇÃO**



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JUNHO/2019**

Esse trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Fernanda de Ávila Abreu e coorientação do Doutor Pedro Ernesto Lopes Leão.

CIP - Catalogação na Publicação

T232e Taveira, Igor Nunes
Evolução da magnetotaxia: predição, isolamento e caracterização de bacteriófagos potencialmente transdutores de genes de biomineralização / Igor Nunes Taveira. -- Rio de Janeiro, 2019.
81 f.

Orientadora: Fernanda de Ávila Abreu.
Coorientador: Pedro Ernesto Lopes Leão.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. bactérias magnetotáticas. 2. biomineralização. 3. fagos. 4. magnetotaxia. 5. transdução. I. Abreu, Fernanda de Ávila , orient. II. Leão, Pedro Ernesto Lopes , coorient. III. Título.

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

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: Igor Nunes Taveira

DRE: 116033151

BANCA EXAMINADORA: Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Presidente)
 Profa. Dirlei Nico
 Dr. Fernando Pereira de Almeida
 Dra. Sabrina Martins Lage Cedrola (Suplente)

Título da Monografia: "Evolução da magnetotaxia: predição, isolamento e caracterização de bacteriófagos potencialmente transdutores de genes de biomineralização"

Local: Sala de Reunião do Departamento de Microbiologia Geral / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 27 de junho de 2019 às 13:30h

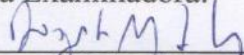
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 27 de Junho..... de 2019.

NOTA

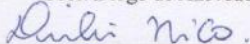
10.0

Banca Examinadora:



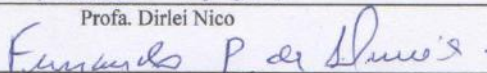
Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius

10.0



Profa. Dirlei Nico

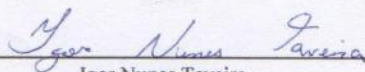
10.0



Dr. Fernando Pereira de Almeida

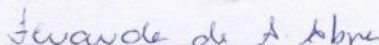
Dra. Sabrina Martins Lage Cedrola

Aluno:



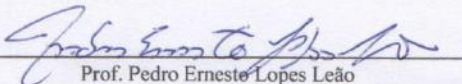
Igor Nunes Taveira

Orientador:



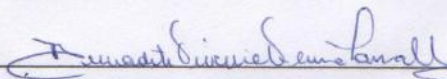
Profa. Fernanda de Ávila Abreu

Coorientador:



Prof. Pedro Ernesto Lopes Leão

**Coordenador
de TCC**



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico essa monografia a minha vó Maria Helena que ficaria muito feliz se pudesse presenciar essa vitória. Essa conquista é nossa!

Agradecimentos

Muita gente participou desta caminhada que representa a realização de um sonho.

Em primeiro lugar, agradeço a minha mãe Denise e meu pai Alberto que não mediram esforços pra que eu tivesse tudo que eles não tiveram. São exemplos de caráter e dedicação que vou levar pra minha vida. Se hoje estou aqui é por causa de muito sacrifício deles.

Agradeço a minha vó Maria Helena pela minha criação e pelas boas memórias que vou guardar comigo. Agradeço meu tio avô Luís pelo carinho que sempre teve comigo e minha tia avó Maria pelas inúmeras risadas e conselhos.

Agradeço a minha namorada Camila que participou de todo esse processo passando por um turbilhão de emoções comigo. Mesmo com os encontros e desencontros que a vida nos proporcionou conseguimos concluir essa etapa juntos. Obrigado por ser quem você é, essa baiana arretada, e por ter me apresentado a banana da terra e carne de sol. Valeu, Bife!

Agradeço a minha orientadora Fernanda por tudo que ela faz e representa. Seria muito injusto descrever seus esforços aqui. Levo seu exemplo de garra, luta e profissionalismo no coração. Talvez seja a pessoa mais citada nesse trabalho e não é à toa. Com certeza é o exemplo de profissional que quero ser. Sou grato pela amizade e confiança que foi construída. “Conversa comigo”.

Agradeço ao meu coorientador Pedro por todos os ensinamentos de bancada. Pelas discussões diárias sobre ciência e a carreira que escolhemos seguir. Sou grato pela amizade e desejo boa sorte nessa nova jornada.

Agradeço ao professor Ulysses por ter transformado o LaBMax no que ele é hoje. Por ter formado profissionais excelentes. Espero contribuir para a manutenção do seu legado e continuar trazendo novidades para o grupo. Você faz muita falta aqui. “Essa foto não dá pra mostrar nem pra mãe”.

Agradeço aos amigos que fiz no LaBMax nesses dois anos. Almoços e jantas no bandeirão com muitas conversas boas e risadas certamente tornaram os dias de trabalho muito mais agradáveis. Sou grato por todos os ensinamentos passados e por bons momentos que passamos nesses últimos dois anos.

Agradeço aos amigos que fiz na UFRJ: Bruno, Isadora, Matheus e Martinha. A amizade de vocês tornou os dias no Fundão bem mais fáceis. Obrigado por embarcarem nessa jornada comigo.

Agradeço aos meus amigos da UFF: Goiaba, Aquiles, Lucas, Joana, Rebeca, Jéssica e Eric. Guardo a amizade de vocês no meu coração e muito obrigado por todas as madrugadas que viramos estudando.

Sou grato ao professor Osvaldo por ter me orientado no meu primeiro ano aqui na UFRJ e pelos ensinamentos passados.

Devo bastante coisa aos meus amigos Felipe, Biel, Fred, Pedro, Jorge, Leo e Julinha que estiveram comigo durante a maior parte da minha vida. Com vocês a caminhada se tornou mais leve. Vocês fazem parte dessa história.

Agradeço ao professor Dennis Bazylnski, o “pai” da bactéria magnetotática, por sempre colaborar com nosso grupo e pelo exemplo de profissional.

Agradeço ao professor Marcos Farina por ter me cedido a bolsa de iniciação científica no final da graduação e por tudo que faz pelo nosso grupo. “Bactéria na veia”.

Agradeço ao Anderson e Rodolfo por todos os resultados que pude gerar no citômetro da Biologia. Essa colaboração é valiosa e com certeza vamos trabalhar juntos em outros projetos. Obrigado por dividirem esse conhecimento comigo.

Agradeço a FAPERJ, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a pesquisa.

Agradeço a UFRJ e ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes. Sou grato pela utilização de toda infraestrutura bem como o apoio de todo o corpo docente e técnico do Instituto de Microbiologia.

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

RESUMO

IGOR NUNES TAVEIRA

EVOLUÇÃO DA MAGNETOTAXIA: PREDIÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS POTENCIALMENTE TRANSDUTORAS DE GENES DE BIOMINERALIZAÇÃO

Orientadora: Fernanda Abreu

Bactérias magnetotáticas (BMs) compõem um grupo de bactérias Gram-negativas que possuem diversidade morfológica, filogenética e metabólica, apresentando a capacidade sintetizar nanocristais ferromagnéticos envoltos por uma membrana biológica, os magnetossomos. Magnetossomos são organelas que auxiliam na navegação destes microrganismos em colunas d'água ou sedimentos quimicamente estratificados, utilizando o campo magnético da Terra como guia. Esse comportamento é conhecido como magnetotaxia. A biomineralização do magnetossomo é altamente regulada a nível genético e um conjunto específicos de genes é responsável por esse processo. Embora os genes de biomineralização sejam conhecidos, sua origem e distribuição ao longo da evolução de BMs ainda é desconhecida. Eventos de transferência horizontal de genes (THG) podem explicar o espalhamento da magnetotaxia entre os representantes magnetotáticos dos filos Proteobacteria, Nitrospirae e Omnitrophica. Fagos são a entidade biológica mais abundante no planeta Terra e participam diretamente de processos de transferência de genes, assim como em ciclos biogeoquímicos, controle populacional e ciclagem de matéria orgânica nos oceanos. Nesse trabalho, foram preditos profagos em BMs bem como o isolamento e caracterização de fagos produzidos por *Magnetofaba australis* cepa IT-1. Fagos já foram evidenciados em culturas de *Mf. australis* cepa IT-1 por microscopia eletrônica de varredura e citometria de fluxo (Toledo, 2016). Nossos resultados mostram profagos preditos em genomas de BMs descritas na literatura encontrando-se o predomínio de sequências correspondentes a fagos das famílias Myo-, Siphoviridae e Podoviridae. Análises filogenéticas permitiram inferir que profagos de *Mf. australis* cepa IT-1 estão distantes filogeneticamente dos fagos preditos na BM mais próxima descrita, *Mc. marinus* cepa MC-1. Populações de fagos produzidos por *Mf. australis* cepa IT-1 foram quantificados durante o cultivo e após a purificação destas partículas obtendo-se a ordem de 10^7 bacteriófagos e 10^5 bactérias por mililitro. Bacteriófagos envelopados com diâmetro médio em torno de 100 nm foram observados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e genes de biomineralização foram amplificados por PCR usando o genoma fágico como molde. Estes dados demonstram que fagos são produzidos em cultura por *Mf. australis* cepa IT-1 são potenciais transdutores de genes de biomineralização.

Palavras chave: bactérias magnetotáticas, biomineralização, fagos, magnetotaxia e transdução.

ABSTRACT

IGOR NUNES TAVEIRA

MAGNETOTAXIS EVOLUTION: PREDICTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOMINERALIZATION GENE'S POTENCIAL TRANSDUCING BACTERIOPHAGES

Supervisor: Fernanda Abreu

Magnetotactic bacteria (MTB) are group of Gram-negative bacteria comprising high diversity in morphology, phylogeny and metabolism. They are capable of synthesizing magnetosomes, a ferrimagnetic nanocrystal enveloped by a biological membrane. Magnetosomes are organelles play a role in cell's navigation through chemically stratified water columns or sediments guiding the swim direction along Earth's magnetic field. This behaviour is described as magnetotaxis. Magnetosome's biomineralization is highly controlled at genetic level and a set of genes are responsible for this. Although most biomineralization genes are known, the dispersion of those genes in Proteobacteria, Nitrospirae and Omnitrophica phyla remain unknown. Horizontal gene transfers (HGT) might play a role in magnetotactic behaviour dispersion among those phyla. Phages are the most abundant biological entity on the Earth and are known as transducing particles taking part in biogeochemical cycles, populational control and organic matter cycling in oceans. This work describes prophages predicted in MTB as well as isolating and characterizing phages produced by *Magnetofaba australis* strain IT-1. Phages have been observed in *Mf. australis* strain IT-1 by scanning electron microscopy and flow cytometry (Toledo, 2016). Our results show that prophages predicted in MTB genomes belong to Myo-, Siphoviridae and Podoviridae viral families. Phylogenetic analysis revealed that *Mf. australis* strain IT-1 prophages are phylogenetically distant from prophages of *Mc. marinus* strain MC-1, its most close MTB by 16S rRNA gene phylogeny. Phage populations produced by *Mf. australis* strain IT-1 during cultivation and purified phages were quantified by flow cytometry obtaining the order of magnitude of 10^7 phages and 10^5 bacteria per milliliter. Enveloped phages with average diameter of 100 nm were seen in transmission electron microscopy and biomineralization genes were amplified by PCR using phage genome as template. This data demonstrate that phages are produced during cultivation of *Mf. australis* strain IT-1 and are potential transducers of biomineralization genes.

Keywords: magnetotactic bacteria, biomineralization, magnetotaxis, phages and transduction.

Lista de Figuras

Figura 1. Diversidade morfológica de BMs.	2
Figura 2. Árvore filogenética de BMs cultivadas e não cultivadas baseada em diversos genes marcadores filogenéticos.....	3
Figura 3. Diversidade morfológica de magnetossomos.	4
Figura 4. Modelo estrutural dos cristais que compõem os magnetossomos.....	6
Figura 5. Organização dos genes <i>mam</i> em diferentes BMs.....	9
Figura 6. Descrição do comportamento magnetotático.	10
Figura 7. Filogenia, evolução da magnetotaxia e proteínas associadas à biomineralização segundo a proposta da origem monofilética.	12
Figura 8. Todos os eventos possíveis de THG descritos até o momento.	14
Figura 9. Exemplo de THG entre domínios distintos.....	14
Figura 10. Mecanismos de transdução.	16
Figura 11. Lisogenia e pseudolisogenia.	18
Figura 12. Ilustração da técnica de gota pendente.....	26
Figura 13. Profagos preditos em BMs utilizando a ferramenta PHASTER (Arndt <i>et al.</i> , 2017).....	33
Figura 14. Diversidade filogenética de profagos questionáveis preditos em BMs dos filos Nitrospirae e Omnitrophica.	35
Figura 15. Diversidade filogenética de profagos intactos em cocos magnetotáticos. ...	36
Figura 16. Diversidade filogenética de profagos intactos em bactérias magnetotáticas.	36
Figura 17. Crescimento de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 em meio líquido.....	37
Figura 18. Observação do comportamento magnetotático da BM <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 por DIC.	37
Figura 19. Perfil populacional por citometria de fluxo.	38
Figura 20. Quantificação das populações por citometria de fluxo. A	39
Figura 21. A. e B. Bacteriófagos provavelmente envelopados observados por MET...	40
Figura 22. Diâmetro médio do fago..	40
Figura 23. Eletroforese em gel de agarose do resultado da PCR para o gene que codifica o rRNA 16S.	41
Figura 24. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para os genes <i>mamB</i> , <i>mamC</i> , <i>mamD</i> , <i>mamH</i> e <i>mamK</i> , <i>mamS</i> e <i>mms6</i>	42
Figura 25. Diversidade de fagos estudados até o momento.	45

Figura 26. Quantificação de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e partículas virais por citometria de fluxo (Toledo, 2016).....	46
Figura 27. Organização dos genes de biomineralização em <i>Mf. australis</i> cepa IT-1....	50
Figura 28. Modelos possíveis sobre a evolução da magnetotaxia no domínio Bacteria.	53
Figura 29. Presença de íons de ferro na cauda do fago T4.....	54
Figura 30. “Ferrojan Horse Hypothesis” proposto por Bonnain, Breitbart e Buck, 2016.	54

Lista de Tabelas

Tabela 1. Profagos preditos em publicações sobre genomas de BMs.	20
Tabela 2. Profagos preditos em BMs utilizando PHAST (Zhou <i>et al.</i> , 2011). Retirado de Toledo (2016).	21
Tabela 3. Componentes do meio líquido para cultivo de <i>Mf. australis</i> cepa IT-1.	25
Tabela 4. Componentes da água do mar artificial.	25
Tabela 5. Componentes da solução de minerais.	25
Tabela 6. Componentes da solução de vitaminas.	26
Tabela 7. Componentes do tampão k36.	27
Tabela 8. Iniciadores universais utilizado na PCR para o gene que codifica o rRNA 16S.	28
Tabela 9. Iniciadores usados na PCR para os genes <i>mam</i> e <i>mms6</i>	28
Tabela 10. Componentes do tampão TAE 1x.	29
Tabela 11. Número e classificação de profagos preditos em BMs pelo PHASTER (Arndt <i>et al.</i> , 2017).	32
Tabela 12. Número e classificação de profagos preditos pelo PHASTER (Arndt <i>et al.</i> , 2017) em sequências recuperadas por metagenoma. Sequências obtidas por Lin <i>et al.</i> , 2018.	34

Lista de Abreviaturas e Siglas

- ASW: *artificial sea water* (água do mar artificial)
- B_T: componente do campo magnético terrestre
- BM: bactéria magnetotática
- bp: *basepairs* (pares de base)
- CDS: *coding sequences* (Regiões codificantes)
- DIC: *differential interference contrast microscopy* (microscopia óptica de contraste interferencial diferencial)
- EGM: elemento genético móvel
- GBDP: *Genome Blast Distance Phylogeny* (filogenia de distância genômica por BLAST)
- HGT: *horizontal gene transfer* (transferência horizontal de genes)
- kb: quilopares de base
- LUCA: *last universal common ancestor* (último ancestral comum universal)
- MAI: *Magnetosome island* (ilha do magnetossomo)
- mam*: *magnetosome membrane gene* (gene da membrana do magnetossomo)
- mad*: *magnetosome-associated Deltaproteobacteria gene* (gene do magnetossomo associado a Deltaproteobacteria)
- man*: *magnetosome genes in Nitrospirae* (gene do magnetossomo em Nitrospirae)
- MET: microscopia eletrônica de transmissão
- MEV: microscopia eletrônica de varredura
- MGC: *magnetosome gene cluster* (grupo de genes do magnetossomo)
- MMP: *Multicellular magnetotactic prokaryote* (procarioto multicelular magnetotático)
- mms*: *Magnetosome membrane specific gene* (genes específicos de membrana do magnetossomo)
- MO: microscopia óptica
- MTB: *magnetotactic bacteria* (bactéria magnetotática)
- ORF: *open reading frame* (fase aberta de leitura)
- PAI: *Pathogenicity island* (ilha de patogenicidade)
- PHAST: *Phage Search Tool*
- PHASTER: *Phage Search Tool Enhanced Release*
- qPCR: *quantitative polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase quantitativa).

THG: transferência horizontal de genes

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

VICTOR: *Virus Classification and Tree building Online Resource* (recurso online para classificação de vírus e de montagem de árvore)

ZTOA: zona de transição óxica-anóxica

Índice

1. Introdução	1
1.1 Bactérias magnetotáticas	1
1.2 Magnetossomo	4
1.3 Genes e proteínas de biomineralização do magnetossomo	7
1.4 Evolução de bactérias magnetotáticas	10
1.5 Transferência horizontal de genes	13
1.6 Transdução	14
1.6.1 Transdução generalizada	15
1.6.2 Transdução especializada	17
1.7 Profagos em BMs	18
2. Justificativa	22
3. Objetivos	23
3.1 Objetivos gerais	23
3.2 Objetivos específicos	23
3.2.1 Análise de genomas de BMs e seus respectivos profagos	23
3.2.2 Estudo de profagos em <i>Mf. australis</i> cepa IT-1	23
4. Materiais e Métodos	24
4.1 Predição de profagos em genomas de BMs e análise filogenética	24
4.2 Cultivo da BM <i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1 em meio líquido sob microaerofilia	24
4.3 Microscopia óptica	26
4.4 Purificação das partículas virais	27
4.5 Extração de DNA dos fagos purificados	27
4.6 Reação em cadeia da polimerase	28
4.7 Eletroforese em gel de agarose	29
4.8 Microscopia eletrônica de transmissão	29
4.9 Citometria de fluxo	30
5. Resultados	31
5.1 Predição de profagos em BMs	31
5.2 Filogenia de profagos encontrados em BMs	34
5.3 Cultivo da BM <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 e observação do comportamento magnetotático	36
5.6 Diferenciação e quantificação de populações por citometria de fluxo	38
5.4 Observação das partículas virais por MET	39
5.5 Amplificação de genes de biomineralização e gene que codifica o rRNA 16S40	

6. Discussão	43
6.1 Predição e filogenia de profagos em BMs	43
6.2 Bacteriófagos em <i>Mf. australis</i> cepa IT-1	45
6.2 Estudo do papel de profagos na evolução da magnetotaxia utilizando <i>Mf. australis</i> cepa IT-1 como modelo	48
7. Conclusão	56
8. Referências	57

1. Introdução

1.1 Bactérias magnetotáticas

Bactérias magnetotáticas (BMs) compõem um grupo de bactérias Gram-negativas aquáticas que possuem alta diversidade morfológica, filogenética e metabólica. São capazes de sintetizar magnetossomos e navegam em ambientes quimicamente estratificados, orientando-se de acordo com o campo magnético da Terra. Já foram descritas BMs em ambientes de água doce, salobros, marinhos e hipersalinos (Bazylinski e Frankel, 2004). Esses microrganismos podem ser encontrados tanto em regiões costeiras (Abreu *et al.*, 2018) como também em sedimentos pelágicos e hemipelágicos no Oceano Atlântico (Petermann e Bleil, 1993; Stolz, Chang e Kirschvink, 1986). Evidências da presença de BMs também já foram encontradas em regiões profundas do Oceano Pacífico, como sequências de DNA associadas a esse grupo bacteriano e estruturas similares a magnetossomos (Dong *et al.*, 2016).

A maioria das BMs descritas são mesófilas e estão restritas a ambientes com pH próximo à neutralidade. No entanto, algumas BMs extremófilas já foram descritas: o procarioto multicelular magnetotático (MMP) de ambiente hipersalino, *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* (Abreu *et al.*, 2007), uma BM termofílica com temperatura de crescimento máxima de 63 °C (Lefèvre *et al.*, 2010) e várias cepas de BMs alcalifílicas obrigatórias isoladas de diferentes *habitats* aquáticos na Califórnia, com crescimento ótimo em pH >9,0 (Lefèvre *et al.*, 2011a). Também há relatos de cocos magnetotáticos psicrófilicos que toleram temperaturas abaixo dos 4 °C encontrados na Antártica (Abreu *et al.*, 2016) e uma betaproteobactéria magnetotática encontrada em ambiente ácido (Abreu *et al.*, 2018).

Supõe-se que os diferentes ambientes naturais selecionam populações específicas de acordo com os parâmetros físico-químicos típicos que impõe pressões seletivas diferentes (Schüler, 2008). Formas cocóides predominam em lagos eutrofizados ou águas com alto teor de matéria orgânica, enquanto em ambientes oligotróficos, as populações de BMs são mais diversificadas (Schüler, 2008). Além de selecionarem as populações específicas de BMs, os fatores físico-químicos também estão relacionados ao tipo de mineral presente nos magnetossomos. BMs que sintetizam cristais de greigita parecem estar restritas a ambientes anaeróbios, onde esses microrganismos encontram condições mais redutoras (Bazylinski, Frankel e Jannasch, 1988; Simmons *et al.*, 2004). A salinidade é um dos fatores determinantes na localização de populações específicas de BMs (Spring *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2012).

Aparentemente, os cocos magnetotáticos são os mais abundantes nos diversos ambientes (Lin *et al.*, 2014a) e apresentam alta diversidade relacionada ao tamanho e a organização dos magnetossomos (Spring *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2012).

As BMs apresentam morfologia diversa como cocos, espirilos, vibriões, bastonetes e formas multicelulares (Bazylinski, Frankel e Jannasch, 1988; Bazylinski e Frankel, 2004) (Figura 1). Estas bactérias estão amplamente distribuídas no filo Proteobacteria (nas classes Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- e *Ca.* Etaproteobacteria) (Abreu *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018), no filo Nitrospirae (Lin *et al.*, 2018) e no filo Omnitrophica (Kolinko *et al.*, 2012) (Figura 2). Mais recentemente, análises de dados metagenômicos de amostras do lago Sakinaw (British Columbia – Canadá) sugerem a presença de BMs pertencentes ao filo Latescibacteria. Entretanto, não há dados sobre o comportamento magnetotático ou presença de magnetossomos em bactérias desse filo (Lin e Pan, 2015). Um outro estudo recente realizou análises de dados metagenômicos de amostras coletadas na China e na Austrália que indicaram a presença de genes de biomineralização pertencentes a bactérias da classe Zetaproteobacteria e a classe candidata Lambdaproteobacteria (Lin *et al.*, 2018). Porém, novamente ainda são necessários estudos que comprovem o comportamento magnetotático ou a presença de magnetossomos em microrganismos pertencentes a estes filios.

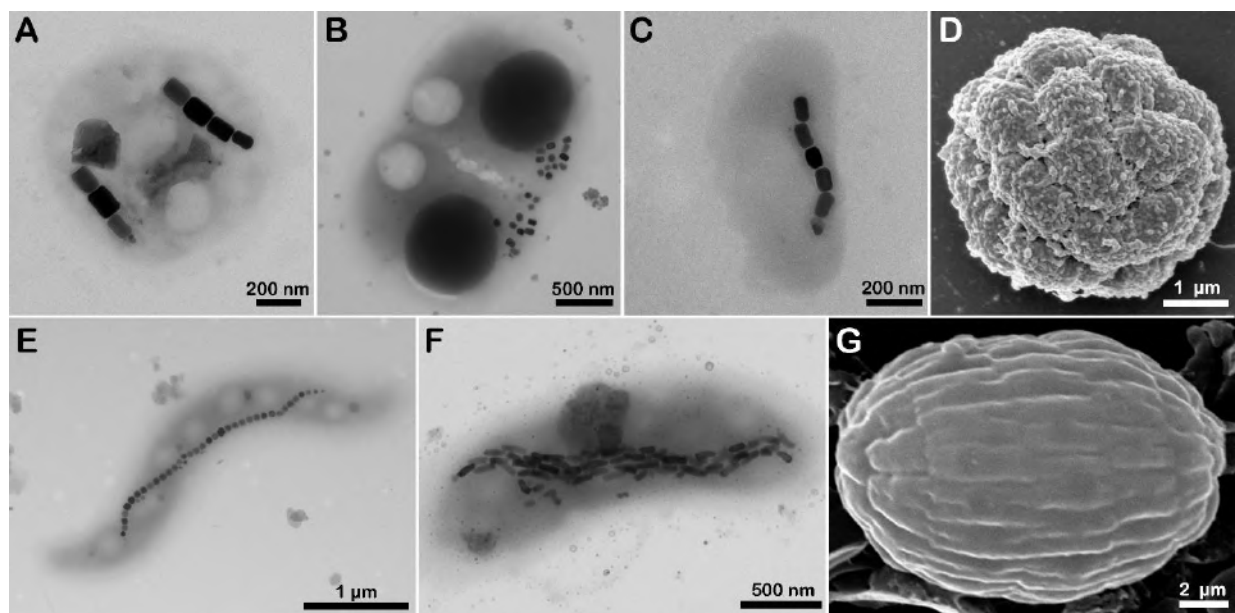


Figura 1. Diversidade morfológica de BMs. **A.** Cocco não cultivado com 2 cadeias de magnetossomos cubo-octaédricos (Paraty Mirim – RJ). **B.** Ovóide não cultivado de Gold Strike apresentando magnetossomos prismáticos desorganizados (Nevada – EUA). **C.** Vibrião não cultivado com magnetossomos prismáticos alinhados em cadeia (Paraty Mirim – RJ). **D.** MMP esférico não cultivado encontrado em lagoa hipersalina (Aruama – RJ). Retirado de Abreu *et al.*, 2008 **E.** Espirilo não cultivado com uma única cadeia de magnetossomos cubo-octaédricos alinhados (Maricá – RJ). **F.** Bacilo não cultivado com magnetossomos anisotrópicos alinhados (Campos dos Goytacazes – RJ). **G.** MMP elipsoide não cultivado encontrado na China (Rongcheng City, China) (Leão *et al.*, 2017). Todas as

1.2 Magnetossomo

O magnetossomo é uma organela constituída de uma bicamada lipídica que envolve um cristal ferromagnético, representando a principal assinatura estrutural das BMs. Estes cristais apresentam tamanhos entre 35 e 120 nm e são compostos por óxido (magnetita; Fe_3O_4) ou sulfeto de ferro (greigita; Fe_3S_4). O cristal é um monodomínio magnético, o que garante a sua permanente magnetização. Isso é explicado pelas propriedades do mineral bem como a faixa de tamanho do cristal e a sua morfologia (Butler e Banerjee, 1975). Os magnetossomos estão organizados em única ou múltiplas cadeias no citoplasma da célula e se mantêm alinhados graças às proteínas do citoesqueleto bacteriano (Bazylnski e Frankel, 2004). Até o presente momento foram descritos cristais de magnetita que possuem morfologia cuboetaédrica, prismático ou anisotrópica (ponta de lança) (Figura 3). Já para os cristais de greigita sua morfologia é usualmente classificada como irregular ou pleiomórfica. Tanto a morfologia dos cristais quanto a composição da membrana biológica são variáveis de acordo com a espécie e as condições nas quais as BMs são encontradas (Grünberg *et al.*, 2004).

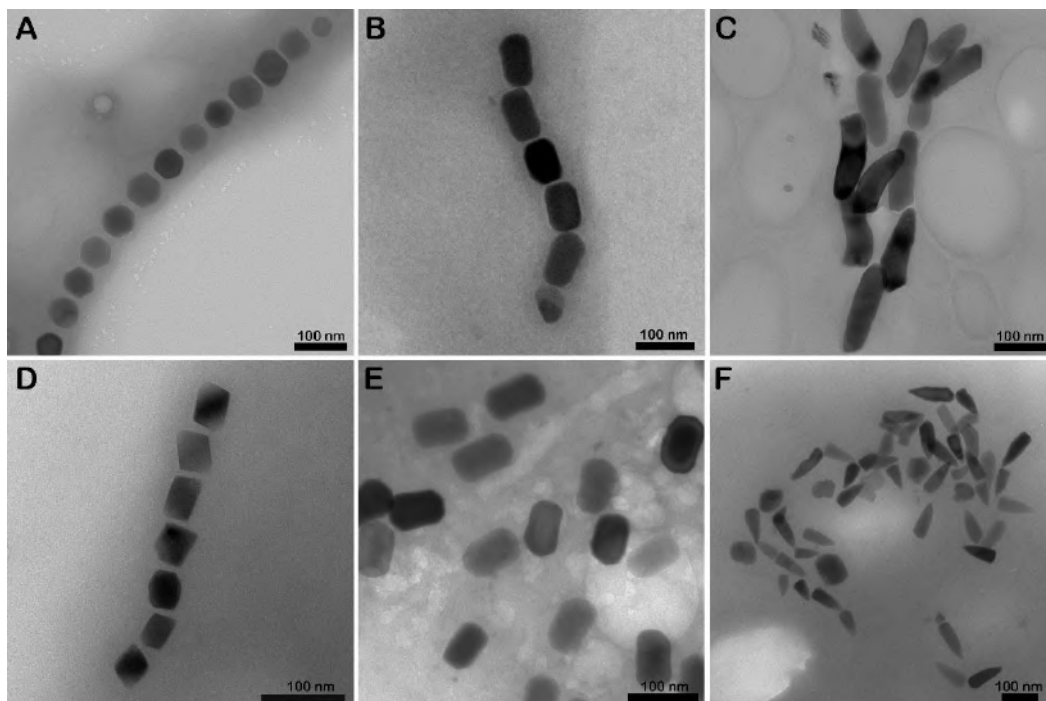


Figura 3. Diversidade morfológica de magnetossomos. **A.** Magnetossomos cuboetaédricos alinhados em cadeia em espirilo não cultivado. **B.** Magnetossomos com morfologia prismática alongada organizados em cadeia em um vibrião encontrado em amostras coletadas no Saco do Mamanguá (Paraty Mirim – RJ). **C.** Seção de um corte ultrafino de um bastonete não cultivado encontrado em amostras provenientes do rio Ururaí (Campos dos Goytacazes – RJ) contendo magnetossomos com morfologia anisotrópica *bullet-shape*. **D.** Cadeia de magnetossomos octaédricos alongados encontrados no interior de um espirilo não cultivado isolado de amostras coletadas no Saco do Mamanguá (Paraty Mirim – RJ). **E.** Magnetossomos de morfologia prismática desorganizados no interior de uma célula ovóide não cultivada encontrada em Gold Strike (Nevada – EUA). **F.** Magnetossomos não

alinhados e de morfologia anisotrópica ponta de lança (Maricá– RJ). Todas as imagens foram obtidas do acervo de imagens do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia do IMPPG, UFRJ.

A composição química e o formato dos magnetossomos são espécie-específica, ou seja, todos os cristais produzidos por uma mesma espécie são idênticos estrutural e quimicamente (Jogler e Schüler, 2009). Entretanto, espécies diferentes podem produzir cristais com estruturas cristalográficas e químicas semelhantes. Até agora existem algumas exceções já documentadas a esta regra como: (i) uma bactéria observada em amostras de sedimento coletadas em Rhode Island - EUA, capaz de alinhar em uma mesma cadeia cristais quimicamente diferentes (Bazylinski *et al.*, 1993); (ii) algumas espécies de MMP encontradas na lagoa de Itaipu em Niterói (Lins *et al.*, 2007), no lago Yuehu na China (Zhang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016) e no mar do Norte na Alemanha (Kolinko *et al.*, 2014) apresentavam magnetossomos de magnetita e greigita ao mesmo tempo; e (iii) por último, a única bactéria produtora de greigita cultivada em laboratório até o presente momento, denominada *Desulfamplus magnetovallimortis* cepa BW-1, cuja variação nas condições de cultivo pode permitir que essa cepa biomineralize cristais de magnetita ou greigita (Descamps *et al.*, 2017).

Dentro do gênero *Magnetospirillum* as espécies como: *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1, *Ms. magnetotacticum* cepa MS-1, *Ms. magneticum* cepa AMB-1, *Ms. caucaseum* cepa SO-1, *Ms. marisnigri* cepa SP-1 e *Ms. moscoviense* cepa BB-1, dentre outras produzem uma única cadeia de magnetossomos de magnetita cuja morfologia é cuboctaédrica (Pósfai *et al.*, 2007; Diziuba *et al.*, 2016) (Figuras 3A, 3D, 4A e 4B). Os vibriões e cocos magnetotáticos costumam apresentar cristais de magnetita com morfologia alongada, classificada como prismática (Pósfai *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2012) (Figuras 3B e 4C), como descrito para as espécies *Magnetovibrio blakemorei* cepas MV-1 (Bazylinski, Frankel e Jannasch, 1988), MV-2 e MV-4 (Meldrum *et al.* 1993a), *Magnetococcus marinus* cepa MC-1 (Meldrum *et al.*, 1993b; Bazylinski *et al.*, 2013a) e nos cocos não cultivados encontrados na China (Zhang *et al.*, 2012) e na lagoa de Itaipu (Farina *et al.*, 1994). Os cristais ponta-de-lança (anisotrópicos) encontrados até o momento são compostos de magnetita enquanto apenas dois trabalhos encontraram cristais ponta de lança de greigita (Abreu *et al.*, 2008; Lefèvre *et al.*, 2011c). Estes cristais ponta de lança de magnetita podem ser encontrados em representantes do filo Nitrospirae (Figura 4D), como *Candidatus* *Magnetoovum mohavensis* cepa LO-1 e *Candidatus* *Thermomagnetovibrio paiutensis* cepa HSMV-1 (Lefèvre *et al.*, 2011b), assim como em representantes da classe Deltaproteobacteria, como os MMPs caracterizados até o momento (Lins *et al.* 2007; Wenter *et*

1.3 Genes e proteínas de biomineralização do magnetossomo

O processo de formação dos magnetossomos é controlado geneticamente pela célula bacteriana, sendo classificado como uma biomineralização biologicamente controlada (Bazylinski & Frankel, 2004). Esse controle é feito em nível genético, existindo conjuntos de genes específicos comuns a todas as BMs descritas até o momento. Esses genes são chamados de genes *mam* (do inglês *magnetosome membrane*) ou *mms* (do inglês *magnetic particle membrane specific*) (Uebe e Schüler, 2016). Além desses, outros genes associados à biomineralização de magnetossomos também já foram descritos, sendo restritos a alguns grupos específicos de BMs, como os genes *mad* (do inglês *magnetosome associated Deltaproteobacteria*), descritos inicialmente em deltaproteobactérias (Lefèvre *et al.*, 2013a), e os genes *man*, descritos inicialmente em BM pertencentes ao filo Nitrospirae (do inglês *magnetosome genes in Nitrospirae*) (Lin *et al.*, 2014b). Entretanto, a função específica e a regulação dos genes *mad* e *man* ainda não foram completamente esclarecidas, principalmente pelo fato de estes genes estarem em sua maioria presentes em BMs não cultivadas.

Como descrito anteriormente, as BMs são capazes de produzir magnetossomos, organelas compostas por cristais ferromagnéticos (Bazylinski e Frankel, 2004). Para que o ferro presente no ambiente seja internalizado pela BM e dê origem ao magnetossomo, uma série de etapas são necessárias. Dentre as principais etapas estão o sequestro de ferro através de bombeamentos ativos para o citoplasma da célula, bem como a deposição dessas partículas de forma organizada e bem estruturada a fim de formar os nanocristais (Werckmann *et al.*, 2017).

Muitos genes *mam* envolvidos na síntese do magnetossomo têm sido identificados nos últimos anos, entretanto os mecanismos moleculares da formação da organela ainda não foram completamente elucidados. Grande parte da informação que se tem sobre o processo de biomineralização dos magnetossomos foi adquirida a partir de estudos realizados nas espécies *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (Taoka *et al.*, 2017) e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 (Murat *et al.*, 2010). Nesses estudos foram realizadas deleções de genes *mam* e *mms*, permitindo que, a partir de alterações fenotípicas nesses mutantes, a função do gene fosse inferida.

As proteínas relacionadas a produção dos magnetossomos pertencem a famílias com características variadas que incluem: proteínas TPR (*Tetratrico Peptide Repeat*: MamA), transportadores CDF (*Cation Diffusion Facilitators*: MamB e MamM), serina proteases HtrA-like (MamE, MamP e MamO), proteínas actina-like (MamK), transportadores genéricos (MamH

e MamN) e proteínas específicas de BMs sem homologia com outras proteínas em organismos não magnéticos (MamG, MamF, MamD, MamC, MamJ, MamW, MamX, MamY, Mms6, MtxA) (Uebe e Schüler, 2016). De forma geral, as proteínas Mam estão envolvidas em quatro funções principais na formação do magnetossomo: (i) formação da membrana do magnetossomo (MamI, MamL e MamAB); (ii) formação do cristal (MamE, Mms6, MamB e MamM); (iii) maturação do cristal (MamE, MmsF, MamGFDC e Mam P, S, T); e (iv) alinhamento do magnetossomo em cadeia (MamJ e MamK) (Murat *et al.*, 2010).

Com o avanço das técnicas moleculares muitas BMs tiveram seus genomas sequenciados e, portanto, novas análises e comparações entre esse grupo de procariotos foi possível. Até o momento estão disponíveis os genomas completos das alfa-proteobactérias produtoras de magnetossomos de magnetita (Matsunaga *et al.*, 2005; Lohße *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015) e delta-proteobactérias magnetotáticas produtoras de magnetita ou de ambos minerais (Nakazawa *et al.*, 2009; Kovaliova *et al.*, 2017; Descamps *et al.*, 2017). Devido à relativa facilidade em se obter amostras contendo BMs não cultiváveis a partir de amostras ambientais, alguns genomas parciais de espécies não cultivadas também foram descritos (Abreu *et al.*, 2013; Lefèvre *et al.*, 2013a; Lefèvre *et al.*, 2012; Jogler *et al.*, 2010; Kolinko *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2014b). O estudo do genoma dessas BMs não cultivadas permitiu a identificação de genes *mam* e *mms* em espécies do filo Nitrospirae (Jogler *et al.*, 2010) e a descoberta de que os genes de biomineralização de greigita e magnetita possuem origem comum (Abreu *et al.*, 2011). Dentre as BMs produtoras de greigita, as espécies *Ca. M. multicellularis* e *Ca. D. magnetomortis* cepa BW-1 são as únicas das quais se conhecem os genes envolvidos na biomineralização do magnetossomo. Além disso, a bactéria *Ca. D. magnetomortis* cepa BW-1 pode produzir cristais tanto de magnetita quanto greigita, dependendo das condições de crescimento (Lefèvre *et al.*, 2011c).

Análises comparativas dos genomas totais ou parciais das BMs pertencentes a classe Alphaproteobacteria e *Ca. Etaproteobacteria* revelaram uma região bem conservada e móvel que, em analogia as ilhas de patogenicidade, foi chamada de ilha do magnetossomo (MAI, *MAGnetosome Island*), que contém genes essenciais para a formação de magnetossomos (Richter *et al.*, 2007). A análise comparativa dos genomas de BMs de Proteobacteria e Nitrospirae mostrou que esses genes são conservados (Figura 5; Lefèvre e Wu, 2013).



Figura 5. Organização dos genes *mam* em diferentes BMs. Os genes *mam* conservados em todas as BMs apresentam setas coloridas com letras em preto. Os genes encontrados unicamente em algumas bactérias estão indicados por setas pretas e letras em cinza.

1.4 Evolução de bactérias magnetotáticas

O alinhamento em cadeia dos nanocristais ferromagnéticos faz com que o momento magnético de cada cristal seja somado, o que confere à célula um momento dipolo magnético otimizado, e sendo responsável pela capacidade das BMs de se orientarem passivamente ao longo das linhas do campo magnético da Terra (B_T) (Dunin-Borkowski *et al.*, 1998). Somado ao alinhamento passivo ao B_T está a capacidade de natação ativa destes microrganismos, promovendo a navegação da célula através de ambientes quimicamente estratificados na coluna d'água ou sedimento. Estas duas características descrevem a magnetotaxia, ou seja, comportamento magnetotático (Bazylinski e Frankel, 2004).

O comportamento magnetotático geralmente está associado a outros tipos de quimiotaxia em busca de condições ideais de sobrevivência. Um exemplo é o cofuncionamento da magnetotaxia e a quimiotaxia associada a concentração de O_2 , dando origem ao termo magneto-aerotaxia (Figura 6). Esse termo foi primeiramente usado para descrever o comportamento de espirilos (Blakemore, Maratea e Wolfe, 1979) e posteriormente cocos magnetotáticos (Frankel *et al.*, 1997). Desta forma, as BMs buscam a zona de transição óxica-anóxica (ZTOA) (Frankel, Williams e Bazylinski, 2006), região que apresenta condições de microaerofilia na coluna d'água ou sedimento e onde a força próton-motiva gerada pela célula é máxima (Zhulin *et al.*, 1996).

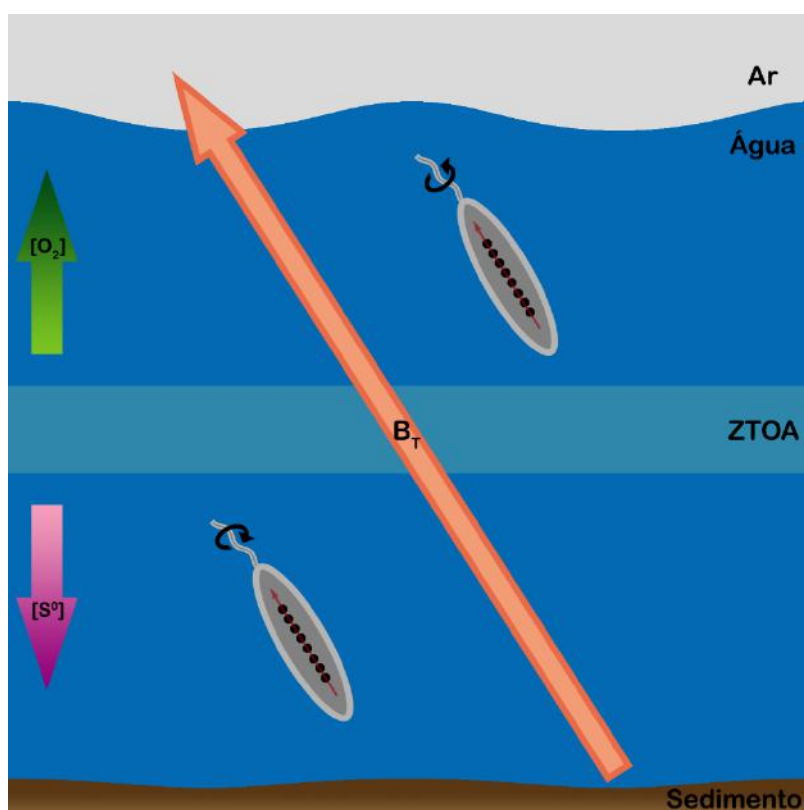


Figura 6. Descrição do comportamento magnetotático. A cadeia de magnetossomos (preto) é alinhada passivamente em relação à componente do B_T (seta rosa). O torque na cadeia de magnetossomos é transferido para a célula e o corpo celular é alinhado de acordo com a componente do B_T (seta vermelho claro). Existem duas situações: (i) quando a célula está abaixo da ZTOA, o flagelo rotaciona em sentido horário permitindo que a célula suba na coluna d'água nadando paralelamente a componente do B_T ; e (ii) quando a célula está acima da ZTOA, o flagelo rotaciona em sentido anti-horário permitindo que a célula desça na coluna d'água nadando antiparalelamente a componente do B_T . Gradientes de enxofre (seta rosa) e oxigênio (seta verde) também estão representados.

O surgimento da magnetotaxia e a sua distribuição pelos diferentes filios do domínio Bacteria sempre foi um dos temas de maior discussão entre os grupos que se dedicam ao estudo de BMs. Apesar de essa linha de pesquisa ser relativamente recente, um grande número de BMs já foi estudado até o momento e o que marca esse grupo é a grande diversidade do ponto de vista ecológico, metabólico e filogenético. Somando isso a característica da organização particular dos genes envolvidos na produção dos magnetossomos, três possíveis hipóteses sobre a evolução de BMs foram propostas ao longo do tempo e são alvo de constante discussão.

A primeira hipótese proposta foi a de que BMs que sintetizam magnetossomos de magnetita teriam evoluído independentemente daquelas capazes de produzir magnetossomos de greigita (DeLong, Frankel e Bazylinski, 1993). Essa hipótese propõe uma origem polifilética da magnetotaxia, sugerindo que as BMs produtoras de magnetita e greigita teriam evoluído independentemente sem compartilhar um ancestral comum. Tal sugestão se fez possível com base nos estudos dos parâmetros bioquímicos e nutricionais para síntese de magnetita e greigita serem completamente diferentes. Além disso, pelo conhecimento da época sabia-se que todas as alfa-proteobactérias magnetotáticas sintetizavam magnetossomos de magnetita e as delta-proteobactérias magnetotáticas sintetizavam magnetossomos de greigita, corroborando com a hipótese citada acima (DeLong, Frankel e Bazylinski, 1993).

Essa hipótese foi refutada dado que MGCs (do inglês *magnetosome gene cluster*) de magnetita e greigita têm origem comum. Especula-se que a biomineralização de magnetossomos greigita pode ter surgido a partir de uma modificação nos genes de biomineralização de magnetossomos de magnetita em bactérias redutoras de sulfato, como o MMP *Ca. Magnetoglobus multicellularis* (Abreu *et al.*, 2011).

Apoiado nessa evidência, foi proposta a origem monofilética do surgimento da magnetotaxia após observar-se que a evolução baseada nas sequências de proteínas Mam conservadas entre BMs de diferentes filios e no gene que codifica o rRNA 16S se apresentavam de forma similar (Figura 7). Essa informação sugere que todas as BMs do filo Proteobacteria dividiram um mesmo ancestral comum que era magnetotático, e ao longo do tempo, conforme diferentes pressões seletivas ocorriam, alguns microrganismos teriam perdido a capacidade de biomineralizar o magnetossomo, resultando na perda da magnetotaxia nestes indivíduos durante a evolução (Lefèvre *et al.*, 2013b).

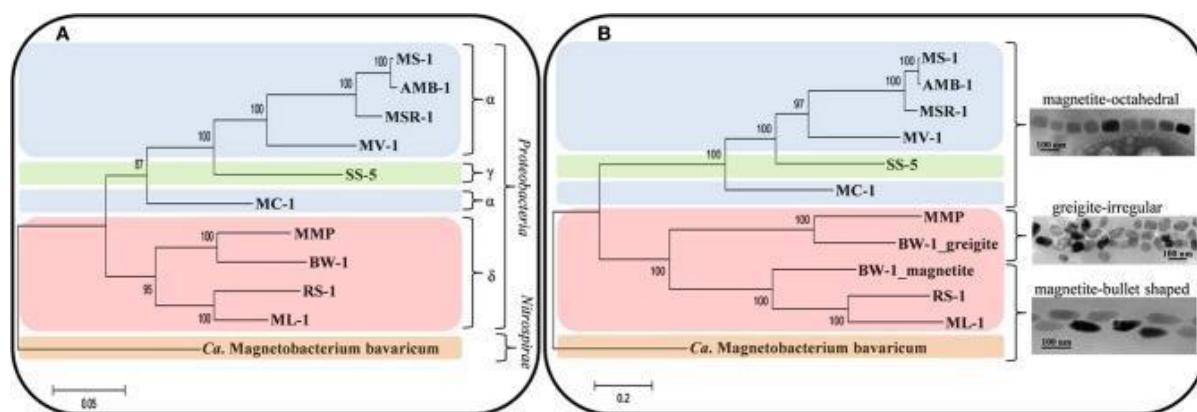


Figura 7. Filogenia, evolução da magnetotaxia e proteínas associadas à biomineralização segundo a proposta da origem monofilética. **A.** Árvore filogenética baseada no gene que codifica o rRNA 16S; **B.** Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas das proteínas conservadas MamABIKQ entre BMs. Figura retirada de Lefèvre *et al.* (2013b). Note a congruência das árvores filogenéticas.

Por fim, existe uma corrente de pesquisadores que basearam sua hipótese na importância de múltiplos eventos de THG de biomineralização na evolução de BMs (Schübbe *et al.*, 2003; Richter *et al.*, 2007; Jogler *et al.*, 2009, Jogler e Schüller, 2009). A partir desses eventos, diferentes espécies de diferentes filos teriam recebido de forma horizontal (não hereditária) genes de biomineralização fazendo com que bactérias não magnetotáticas se tornassem de fato magnetotáticas e capazes de biomineralizar o magnetossomo.

Em 2017, um estudo realizado por metagenômica, filogenia e datação molecular bayesiana propôs que o grupo de genes responsável pela biomineralização de magnetossomos e o arranjo de magnetossomo em cadeia(s) dentro das células, tiveram origem anterior ou próxima à divergência dos filos Nitrospirae e Proteobacteria (Lin *et al.*, 2017). Essa divergência filogenética ocorreu cerca de 2.7 bilhões de anos atrás no éon Arqueano antes do evento da Grande Oxigenação (Lin *et al.*, 2017). Sabe-se que o B_T se originou há pelo menos 4.2 bilhões de anos atrás e sofreu diversas inversões durante o curso do tempo (Tarduno *et al.*, 2015). Considerando esse panorama, é provável que a magnetotaxia e o B_T tenham coevoluído ao longo do tempo selecionando BMs capazes de resistir a tais variações, bióticas e abióticas, durante o curso do tempo geológico da Terra (Lin *et al.*, 2017).

Lin *et al.*, (2018) publicou o primeiro estudo em larga escala de metagenoma de BMs propondo dois modelos sobre evolução da magnetotaxia. Ambos modelos propõe eventos de THG para explicar o espalhamento dos genes de biomineralização entre os filos Proteobacteria, Nitrospirae e Omnitrophica. Nesse estudo foram recuperadas sequências de metagenoma contendo genes para biomineralização do magnetossomo nas classes Zetaproteobacteria, nas

classes candidatas Lambdaproteobacteria e Etaproteobacteria além de organizar os cocos magnetotáticos na classe candidata Etaproteobacteria.

1.5 Transferência horizontal de genes

O fenômeno da THG é caracterizado pelo fato de que genes possam ser compartilhados entre seres de mesma geração através de elementos genéticos móveis (EGMs) e não através do conceito clássico de hereditariedade ou transferência vertical. A primeira observação desses eventos foi descrita em 1928 em cepas de *Pneumococcus* (Griffith, 1928), porém a THG só começou a ser associada com a evolução dos seres vivos 20 anos após a sua descoberta. Esse fenômeno de transferência genética em bactérias ocorre basicamente graças a três fenômenos principais, sendo estes: conjugação, transformação e transdução (Figura 8). Todos estes envolvem uma célula doadora – aquela que doa, direta ou indiretamente, parte de seu DNA seja ele cromossomal ou plasmidial – para uma célula receptora. Uma vez ocorrida a transferência, geralmente parte do DNA do doador é incorporado ao genoma do receptor e o material genético restante é degradado por nucleases. A célula receptora, que recebeu esse material genético, é chamada de recombinante (Gogarten e Townsend, 2005).

A descoberta da THG permitiu aos pesquisadores classificarem este evento como uma importante força que confere maior diversidade fenotípica entre indivíduos e, portanto, os molda de acordo com as pressões evolutivas sofridas por estes (Soucy, Huang e Gogarten, 2014). Hoje sabe-se que eventos de THG desempenham um papel importante também na diversidade da evolução do genoma de eucariotos, não sendo estes eventos restritos a evolução de procariotos (Keeling e Palmer, 2008) (Figura 9). Genes podem ser transferidos de forma horizontal tanto entre espécies de bactérias bem como transferidos entre domínios como o fluxo de genes de bactérias e arqueias para eucariotos (Soucy, Huang e Gogarten, 2015). Exemplo desta transferência está na figura 8, mostrando a transferência do gene que codifica a biossíntese de riboflavina (Husnik e McCutcheon, 2018).

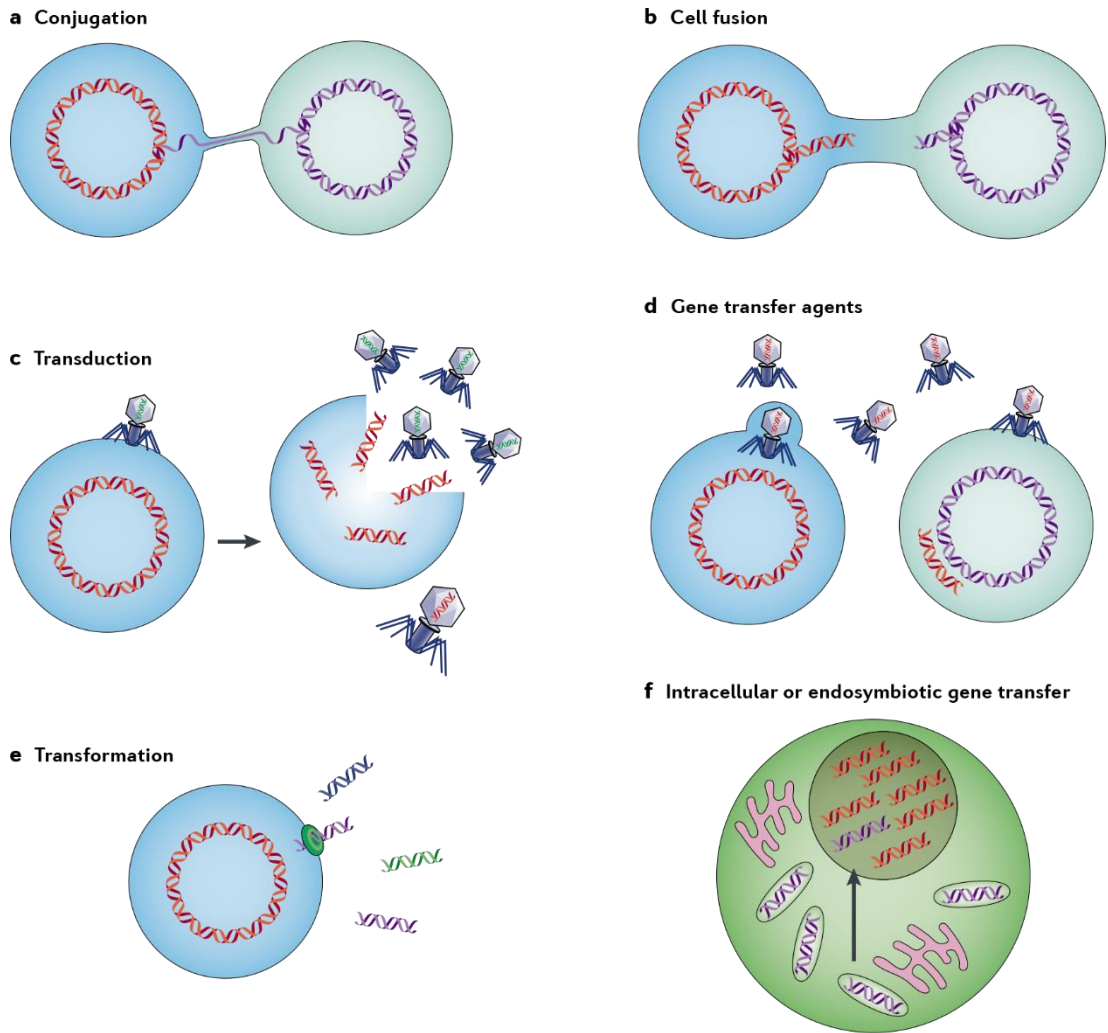


Figura 8. Todos os eventos possíveis de THG descritos até o momento: **A.** Conjugação. **B.** Fusão entre células. **C.** Transdução. **D.** Agentes de transferência de genes. **E.** Transformação. **F.** Transferência por endossimbiose. Retirado de Soucy, Huang e Gogarten (2015).

Alphaproteobacteria: Rickettsiales

Insecta: Pseudococcidae

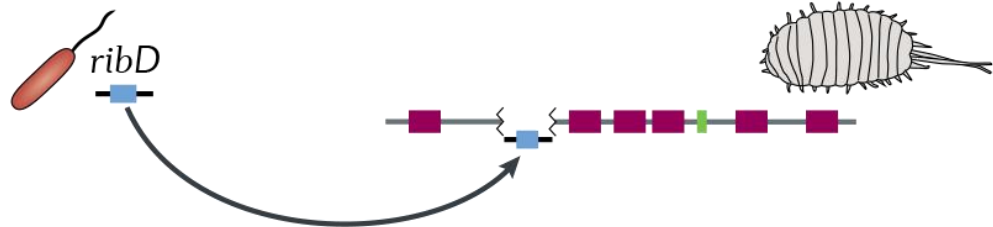


Figura 9. Exemplo de THG entre domínios distintos. O gene *ribD*, referente a biossíntese de riboflavina (vitamina B₂), foi transferido horizontalmente de uma alfa-proteobactéria para um inseto da família Pseudococcidae (Husnik e McCutcheon, 2018). Figura retirada de Husnik e McCutcheon (2018).

1.6 Transdução

Transdução é o processo pelo qual o DNA pode ser transferido de uma célula bacteriana a outra via a ação de fagos. Esse fenômeno foi primeiramente descrito na década de 1950 nas bactérias *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* (Zinder e Lederberg, 1952) e *Pseudomonas aeruginosa* através da ação do fago P110 (Holloway e Monk, 1959). São descritos dois tipos de transdução: a generalizada e a especializada (Figura 10). Na transdução generalizada segmentos de ácidos nucleicos são randomicamente incorporados dentro do capsídeo viral durante a montagem da partícula viral. Na transdução especializada o genoma de um fago integra o genoma bacteriano, assumindo a forma de profago. Durante a sua fase de excisão do genoma bacteriano, o profago é capaz de carrear regiões do DNA que flanqueiam a região a qual ele foi incorporado. Fagos capazes de se integrar ao genoma da célula hospedeira são denominados fagos temperados.

A transdução ocorre em uma variedade de bactérias, no entanto nem todos os fagos são capazes de transduzir, assim como nem todas as bactérias são transduzíveis e tampouco todos os ácidos nucleicos de bactérias são transduzíveis. Embora tais condições, o fenômeno é suficientemente disseminado e, por isso, desempenha um importante papel na transferência gênica na natureza (Clokier *et al.*, 2011). O papel dos fagos na transferência gênica é justificado por evidências como o fato de serem a entidade biológica mais abundante do planeta Terra. Estima-se que existam 10^{31} partículas no globo (Brüssow e Hendrix, 2002) e que os oceanos são o maior reservatório destes vírus, contendo de 10^7 a 10^8 fagos por mililitro (Suttle, 2007). Também são conhecidos por participarem de ciclos biogeoquímicos e por controlarem as populações bacterianas respectivas ao nicho que ocupam (Fuhrman, 1999).

Exemplos de genes transferidos por fagos são massivamente descritos em estudos de resistência bacteriana bem como genes que codificam proteínas que participam da fotossíntese em cianobactérias e fixação de Nitrogênio em diversas espécies (Balcazar, 2014).

1.6.1 Transdução generalizada

Historicamente, os primeiros estudos sobre transdução generalizada foram publicados estudando as espécies *Salmonella enterica* com o fago P22 (Zinder e Lederberg, 1952; Susskind e Botstein, 1978) e *Escherichia coli* com os fagos P1 (Lennox, 1955). Hoje sabe-se que durante a replicação dos fagos, o DNA e as proteínas fágicas são sintetizados pela célula bacteriana

hospedeira. Durante a etapa de montagem do fago, as proteínas do capsídeo devem se polimerizar e formar uma estrutura que seja capaz de receber o DNA viral que deve ser internalizado no capsídeo. Entretanto, o DNA bacteriano, o DNA plasmidial ou até mesmo o DNA de outro fago podem ser empacotados dentro do capsídeo proteico de forma randômica. Virtualmente, todos os genes contidos dentro de uma bactéria infectada por um fago transdutor generalizado têm probabilidades iguais de serem empacotados em um revestimento de fago e transferidos para uma outra bactéria posteriormente infectada (Salmond e Fineran, 2015) (Figura 10B). O empacotamento acidental do DNA da célula hospedeira pode ocorrer a uma frequência de 1 em cada 10^5 a 10^6 eventos (Salmond e Fineran, 2015). A partícula viral resultante é denominada partícula transdutora. Quando essa partícula transdutora carrega todos os genes capazes de promover uma infecção em uma nova bactéria, esse fago é chamado de completo ou intacto. Quando partículas transdutoras são incapazes de promover uma infecção viral, elas são referidas como defectivas ou questionáveis por não conter todos os genes necessários para promover uma nova infecção. Ambos os tipos de partículas, completas e defectivas, são liberadas no ambiente (Figura 10) (Clokier *et al.*, 2011).

Durante a infecção de uma nova célula bacteriana, o DNA fágico pode sofrer 3 destinos: (i) esse DNA será absorvido pela bactéria, degradado e seus nucleotídeos serão reciclados para uso no DNA bacteriano; (ii) caso esse DNA original seja um plasmídeo, no momento que ele entrar na célula hospedeira ele poderá se recircularizar novamente e se manter na célula bacteriana; ou (iii) caso o DNA fágico seja homólogo a uma região do cromossomo da célula hospedeira, haverá a troca de material genético entre ambos de forma similar a recombinação homóloga em bactérias (Brüssow, Canchaya e Hardt, 2004).

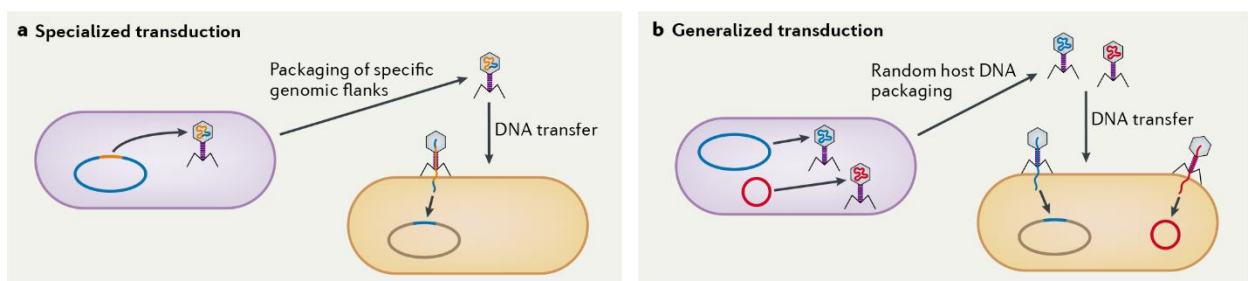


Figura 10. Mecanismos de transdução. **A.** Modelo de como ocorre a transdução especializada na qual somente uma região específica do genoma do hospedeiro é carregada pelo fago. **B.** Modelo de como ocorre a transdução generalizada, na qual fragmentos randômicos de ácidos nucleicos são empacotados no capsídeo. Figura retirada de Salmond e Finerman (2015).

1.6.2 Transdução especializada

A transdução generalizada permite a transferência de qualquer gene de uma bactéria à outra, porém com baixa frequência. Por outro lado, a transdução especializada permite uma transferência extremamente eficiente, de forma seletiva, transferindo apenas uma pequena região do cromossomo bacteriano (Figura 10A). O primeiro caso descrito de transdução especializada foi observado em genes envolvidos no metabolismo da galactose transduzidos pelo fago λ (Sato e Campbell, 1970) e pelo fago $\phi 81$ (Takeda, Morishita e Yura, 1970) ambos na espécie *E. coli*.

Ao infectar a célula, o DNA do fago integra-se ao genoma bacteriano, caracterizando o processo de lisogenia. O genoma fágico integra-se ao cromossomo ou plasmídeo da célula hospedeira em um sítio específico através de um processo de recombinação homóloga (Soucy, Huang e Gogarten, 2015). Uma vez integrado, os genes que pertencem ao genoma fágico é chamado profago (Figura 11A). Após a inserção, a replicação do DNA viral passa a ser controlada pela célula bacteriana hospedeira. Quando ocorre a indução do ciclo lítico, o DNA fágico separa-se do DNA hospedeiro por um processo inverso à integração. Geralmente, o DNA do fago é excisado precisamente como uma unidade. Porém, ocasionalmente, o genoma do fago é excisado de forma incorreta e alguns dos genes bacterianos adjacentes a uma das extremidades do profago são excisados juntamente com o DNA viral. Concomitantemente, alguns genes virais são perdidos durante esse processo visto que o capsídeo comporta um número limitado de pares de base. Esta partícula transdutora pode subsequentemente transferir para uma célula receptora genes bacterianos que foram previamente internalizados em seu capsídeo (Feiss, Adyha e Court, 1972; Hogness, 1966).

A lisogenia, fenômeno apresentado acima, apresenta três consequências importantes. Em primeiro lugar, as células lisogênicas são imunes à reinfecção pelo mesmo fago, entretanto, não são imunes à infecção por outros tipos de fagos. A segunda consequência é que as células hospedeiras podem exibir novas propriedades, o que é conhecido como conversão fágica. Por exemplo, a bactéria *Corynebacterium diphtheriae*, que causa a difteria, é um patógeno cujas características promotoras da doença são relacionadas à síntese de uma toxina. Essa bactéria só pode produzir a toxina quando possui um fago temperado, pois o gene que codifica esta toxina está no profago (Welkos e Holmes, 1981). O fago temperado é capaz de disparar o ciclo lisogênico, embora nem todos os fagos temperados sejam capazes de integrar seu material genético ao cromossomo bacteriano. Em alguns casos o genoma do fago pode circularizar e permanecer no citoplasma da bactéria, na forma epissomal, sem que haja a integração ao

cromossomo, caracterizando um ciclo pseudolisogênico (Salmond e Fineran, 2015) (Figura 11B). A terceira consequência da lisogenia é que ela torna possível a transdução especializada, como visto acima.

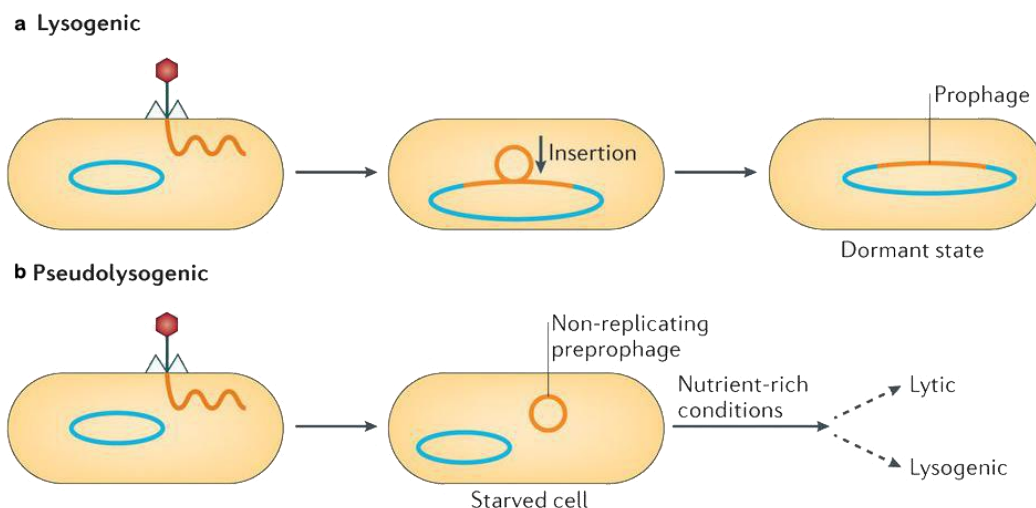


Figura 11. Lisogenia e pseudolisogenia. **A.** Ciclo lisogênico. O genoma do fago é integrado ao da célula hospedeira e então transferido de forma vertical para as próximas linhagens bacterianas. **B.** Ciclo pseudolisogênico. O genoma do fago não é degradado pela célula hospedeira e então é circularizado na forma epissomal. Figura retirada de Feiner *et al.* (2015).

1.7 Profagos em BMs

Estudos envolvendo os genomas de BMs permitiram a descoberta de profagos e genes relacionados a fagos no genoma de BMs (Schübbe *et al.*, 2009; Rioux *et al.*, 2010; Lefèvre e Bazyliniski, 2013). Em especial, os genes de fagos encontrados em regiões próximas aos *operons* que contêm genes de biomineralização, podem representar um indício da correlação entre fagos e a transferência desses genes de biomineralização entre espécies bacterianas (Rioux *et al.*, 2010). No entanto, até o momento, a transdução não foi avaliada de forma consistente no cenário da evolução da magnetotaxia. Como pode ser observado na tabela 1, poucos trabalhos fizeram a predição de profagos nos genomas de BMs.

A primeira descrição detalhada de profagos em genoma de BMs foi feita por Schübbe *et al.* (2009) no estudo do genoma da bactéria *Mc. marinus* cepa MC-1, no qual foram preditas 14 sequências de profagos com tamanhos variando entre 5,287 a 42,314 pares de base e conteúdo GC entre 52.14 e 58.34%. Ainda no trabalho de Schübbe *et al.* (2009), foram encontradas sequências de profagos incompletos nas BMs *Ms. magneticum* cepa AMB-1 e *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 utilizando a ferramenta Prophage Finder (Bose e Barber, 2006).

Profagos incompletos foram descritos em *Ca. Magnetococcus massalia* cepa MO-1 (Ji *et al.*, 2017). Enquanto a predição de profagos no genoma da BM *Magnetospira thiophila* cepa QH-2 utilizando a ferramenta Prophage Finder (Bose e Barber, 2006) não detectou a presença de nenhum profago completo ou incompleto (Ji *et al.*, 2014).

A observação da BM *Mf. australis* cepa IT-1 por MEV mostrou a presença de inúmeras estruturas regulares na superfície da célula semelhantes a fagos (Toledo, 2016). Na análise do genoma parcial dessa bactéria foram preditos 10 profagos (Toledo, 2016) sendo 3 destes completos e 7 incompletos usando a ferramenta de predição PHASTER (Arndt *et al.*, 2017). O tamanho dos fagos varia entre 10 e 44.5 kb. Foram encontrados fagos associados às famílias Siphoviridae e Myoviridae, sendo essa classificação baseada na similaridade das sequências desses profagos com sequências encontradas no banco de dados do programa PHAST (Zhout *et al.*, 2011).

Estudos da indução química do ciclo lítico de profagos na BM *Mf. australis* cepa IT-1 mostraram duas populações presentes no cultivo desta célula (Toledo, 2016). Tais populações foram evidenciadas por citometria de fluxo através da marcação de ácidos nucleicos. A microscopia eletrônica de transmissão confirmou a presença destas duas populações sendo: (i) a BM estudada e (ii) partículas virais. A célula com e sem indução química do ciclo lítico produziu partículas virais (Toledo, 2016).

Neste trabalho, Toledo (2016) utilizou a ferramenta PHAST (Zhout *et al.*, 2011) para identificar profagos no genoma de outras BMs (Tabela 2). Foram preditos 10 profagos na bactéria *Mc. marinus* cepa MC-1 utilizando o PHAST, divergindo do resultado apresentado por Schübbe *et al.* (2009) que utilizou a ferramenta Prophage Finder (Toledo, 2016).

Tabela 1. Profagos preditos em publicações sobre genomas de BMs.

Grupo filogenético	BM	Nº de acesso	Status do genoma da BM	Classificação	Nº de profagos preditos	Artigo
Alpha-	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> cepa MSR-1	HG794546	Completo	Incompleto	6	Schübbe <i>et al.</i> , 2009
	<i>Magnetospirillum magneticum</i> cepa AMB-1	AP007255	Completo	Incompleto	12	Schübbe <i>et al.</i> , 2009
	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> cepa MS-1	JXSL00000000	Parcial (36 contigs)	Não predito	-	Smalley <i>et al.</i> , 2015
	<i>Magnetospirillum caucaseum</i> cepa SO-1	AONQ01000000	Parcial (261 contigs)	Não predito	-	Grouzdev <i>et al.</i> , 2014
	<i>Magnetospirillum</i> sp. cepa XM-1	PRJEB11958	Completo	Não predito	-	Wang <i>et al.</i> , 2015
	<i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1	JX534168	Parcial (21 contigs)	Não predito	-	Morillo <i>et al.</i> , 2014
	<i>Ca. Magnetococcus massalia</i> cepa MO-1	LO017727	Completo	Incompleto	5	Ji <i>et al.</i> , 2016
	<i>Magnetococcus marinus</i> cepa MC-1	CP000471	Completo	Questionável	14	Schübbe <i>et al.</i> , 2009
	<i>Magnetovibrio blakemorei</i> cepa MV-1	MCGG00000000	Parcial (91 contigs)	Não predito	-	Trubitsyn <i>et al.</i> , 2016
	<i>Ca. Terasakiella magnetica</i> cepa PR-1	PRJEB14583	Parcial	Não predito	-	Monteil <i>et al.</i> , 2018
	<i>Magnetospira tiophila</i> cepa QH-2	PRJEB1386	Completo	Não encontrado	0	Ji <i>et al.</i> , 2013
Gamma-	Gammaproteobacterium cepa SS-5	ABZS01000000	Parcial	Não predito	-	Lefèvre <i>et al.</i> , 2012
	Gammaproteobacterium cepa BW-2	HQ595728	Parcial	Não predito	-	Lefèvre <i>et al.</i> , 2012
Delta-	<i>Desulfovibrio magneticus</i> cepa RS-1	AP010904	Completo	Não predito	-	Nakazawa <i>et al.</i> , 2009
	<i>Desulfovibrio</i> sp. cepa DV	PRJNA344948	Completo	Não predito	-	Kovaliova <i>et al.</i> , 2017
	<i>Ca. Magnetoglobus multicellularis</i>	PRJNA52963	Parcial (3706 contigs)	Não predito	-	Abreu <i>et al.</i> , 2014
	<i>Ca. Magnetomorum</i> cepa HK-1	PRJNA252699	Parcial (3036 contigs)	Não predito	-	Kolinko <i>et al.</i> , 2015
	<i>Ca. Desulfamplus magnetomortis</i> cepa BW-1	PRJEB14757	Completo	Não predito	-	Descamps <i>et al.</i> , 2017
	Deltaproteobacterium cepa FH-1	JF330268.1	Parcial (contig dos genes <i>mam</i>)	Não predito	-	Lefèvre <i>et al.</i> , 2011
	Deltaproteobacterium cepa ML-1	JX869937	Parcial (contig dos genes <i>mam</i>)	Não predito	-	Lefèvre <i>et al.</i> , 2011
<i>Ca. Lambda-</i>	<i>Ca. Lambdaproteobacterium</i> PCRbin3	PDZZ01000000	Parcial (contig dos genes <i>mam</i>)	Não predito	-	Lin <i>et al.</i> , 2018
Zeta-	<i>Ca. Zetaproteobacterium</i> PCbin4	PRJNA400260	Parcial (contig dos genes <i>mam</i>)	Não predito	-	Lin <i>et al.</i> , 2018
Nitrospirae	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i>	LACI00000000	Parcial (2752 contigs)	Não predito	-	Jogler <i>et al.</i> , 2010
	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> cepa CS-04	JZJI00000000	Parcial (1019 contigs)	Não predito	-	Kolinko <i>et al.</i> , 2015
	<i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> cepa HCH-1	NZ_LNQR01000000	Parcial (contig dos genes <i>mam</i>)	Não predito	-	Lin <i>et al.</i> , 2017

	<i>Ca. Magnetobacterium casensis</i>	JMFO00000000	Parcial (70 contigs)	Não predito	-	Lin <i>et al.</i> , 2014
	Nitrospirae bacterium SG8_35_4	LJTM01000000	Parcial (contig dos genes <i>mam</i>)	Não predito	-	Baker <i>et al.</i> , 2015
Planctomycetes	Planctomycetes bacterium SM23_25	LJTY01000000	<i>Parcial (contig dos genes mam)</i>	Não predito	-	Baker <i>et al.</i> , 2015
Omnitrophica	<i>Ca. Omnitrophus magneticus</i> SKK-01	JYNY00000000	Parcial (656 contigs)	Não predito	-	Kolinko <i>et al.</i> , 2014
Latescibacteria	Latescibacteria bacterium SCGC AAA252-B13	ASWY00000000	Parcial (138 contigs)	Não predito	-	Lin <i>et al.</i> , 2017

Tabela 2. Profagos preditos em BMs utilizando PHAST (Zhou *et al.*, 2011). Retirado de Toledo (2016).

Bactéria magnetotática	Profagos preditos		
	intacto ou completo	incompleto ou questionável	Total
<i>Magnetospirillum magneticum</i> cepa AMB-1	3	7	10
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> cepa MS-1	0	2	2
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> cepa MSR-1	0	8	8
<i>Magnetospirillum</i> sp. SO-1	0	0	0
<i>Magnetospira thiophila</i> QH-2	0	0	0
<i>Magnetococcus marinus</i> cepa MC-1	3	7	10
<i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1	3	7	10
<i>Magnetovibrio blakemorei</i> cepa MV-1	0	1	1
Cepa SS-5	0	2	2
<i>Desulfovibrio magneticus</i> cepa RS-1	0	3	3

2. Justificativa

A evolução da magnetotaxia é assunto recente na literatura. Apesar de a THG ser considerada como uma das hipóteses para explicar a grande diversidade de BMs, não há estudo que aborde esse tema especificamente. Uma vez que poucas BMs possuem plasmídeos e estão não conjugativos, é provável que a THG dos genes de biomineralização nesse grupo de bactérias possa ter ocorrido através de fenômenos de transdução e transformação. Dessa forma, a predição de profagos completos e incompletos nos genomas disponíveis de BMs, pode acrescentar informações relevantes sobre as famílias de vírus que infectam BMs e sua capacidade teórica de promover a THG. Outra questão relevante sobre a presença de profagos nos genomas de BMs é se esses são capazes de se replicar através da indução do ciclo lítico. Em vista das observações realizadas em *Mf. australis* cepa IT-1, nas quais foi possível detectar estruturas semelhantes a fagos na superfície da célula, e os resultados da análise da cultura após indução do ciclo lítico por citometria de fluxo, fagos são produzidos na cultura pura da bactéria mantida em laboratório. Assim, a caracterização da ultraestrutura da *Mf. australis* cepa IT-1 pode mostrar evidências importantes sobre a produção de partículas virais, bem como a caracterização ultraestrutural e genômica pode indicar a relevância dos profagos na THG.

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais dessa monografia são (i) detectar a presença de profagos nos genomas de BMs e inferir relações evolutivas e (ii) realizar a visualização e caracterização molecular das partículas virais produzidas durante o crescimento de *Mf. australis* cepa IT-1 em meio líquido.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse projeto foram divididos de acordo com cada item dos objetivos gerais mencionados acima.

3.2.1 Análise de genomas de BMs e seus respectivos profagos

- i. Predição de profagos nos genomas de BMs utilizando PHASTER (Arndt *et al.*, 2017).
- ii. Análise filogenética dos profagos de BMs utilizando VICTOR (Meier-Kolthoff e Göker, 2017).

3.2.2 Estudo de profagos em *Mf. australis* cepa IT-1

- i. Avaliação da produção de partículas virais liberadas pela BM *Mf. australis* cepa IT-1 em meio de cultura líquido por citometria de fluxo.
- ii. Determinação da morfologia da partícula viral purificada após cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1 em meio de cultura líquido através da técnica de contrastação negativa e observação por microscopia eletrônica de transmissão (MET).
- iii. Extração de DNA dos fagos e amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes de biomineralização *mam* e *mms* em seu genoma, garantindo a ausência de contaminação de DNA bacteriano através do controle feito pela ausência do gene que codifica o rRNA 16S.

4. Materiais e Métodos

4.1 Predição de profagos em genomas de BMs e análise filogenética

Foram preditas sequências de profagos em genomas publicados de BMs (Tabela 1) e sequências de metagenoma de Lin *et al.* (2018) utilizando a ferramenta PHASTER (Arndt *et al.*, 2017). Os profagos preditos foram classificados em completo, questionável e incompleto. Os dados obtidos foram comparados aos resultados obtidos na literatura. A análise filogenética de profagos preditos foi realizada pela ferramenta VICTOR (Meier-Kolthoff e Göker, 2017) para inferir relações evolutivas entre essas sequências dentro das BMs descritas na literatura.

4.2 Cultivo da BM *Magnetofaba australis* cepa IT-1 em meio líquido sob microaerofilia

O inóculo inicial da BM *Mf. australis* cepa IT-1 foi obtido do banco de células do próprio Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia (LaBMax). A BM foi cultivada em meio heterotrófico utilizando o succinato e acetato de sódio como fontes de carbono (Morillo *et al.*, 2014) e seus componentes estão listados na Tabela 3. Este é um meio que tem como base a água do mar artificial (ASW – *artificial seawater*) (Tabela 4) e em seguida foram adicionados os seguintes reagentes para um volume final de 500 mL de meio de cultura: (i) 1,2 g HEPES; (ii) 0,15 g de cloreto de amônia como fonte de nitrogênio; (iii) 0,6g de bicarbonato de sódio como fonte autotrófica de carbono; (iv) 0,5 g de acetato de sódio e 0,5 g de succinato de sódio como fontes heterotróficas de carbono; (v) 2,5 mL de solução de minerais (Tabela 5); e (vi) 100 µL de resazurina 0,2% como indicador redox. O pH do meio foi então corrigido para 7,2 utilizando uma solução de HCl 0,1M.

Como a bactéria *Mf. australis* cresce sob condição de microaerofilia, o meio foi purgado com gás nitrogênio (N₂) durante 10 minutos. Em seguida, o *headspace* foi purgado com uma mistura gasosa composta de dióxido de carbono (CO₂) e gás nitrogênio (N₂) durante 10 minutos. O meio foi então autoclavado à 121°C e 1,5 atm durante 30 minutos. O restante dos reagentes foi adicionado em fluxo laminar. Estes foram (para volume de 500 mL de meio de cultura): (i) solução com 0,1g de L-cisteína (pH 7,2); (ii) 750 µL de fosfato dipotássico a 1,86% (pH 7,2); (iii) 1500 µL de sulfato ferroso 10mM; (iv) 250 µL de solução de vitaminas (Tabela 6); e (v) 1500 µL de tiosulfato de sódio 40% (pH 7,2).

Tabela 3. Componentes do meio líquido para cultivo de *Mf. australis* cepa IT-1.

Componentes	Quantidade
Água do mar artificial	500 mL
HEPES	1,2 g
Cloreto de amônia	0,15 g
Bicarbonato de sódio	0,6 g
Acetato de sódio	0,5 g
Succinato de sódio	0,5 g
Solução de minerais	2500 µL
Resazurina (0,2%)	100 µL
L-cisteína	0,1 g
Fosfato dipotássico a 1,86%	750 µL
Sulfato ferroso a 10mM	1500 µL
Solução de vitaminas	250 µL
Tiosulfato de sódio a 40%	1500 µL

Tabela 4. Componentes da água do mar artificial.

Componentes	Quantidade
Água Milli-Q	500 mL
Cloreto de sódio	8,215 g
Cloreto de magnésio	1,745 g
Sulfato de sódio	1,37 g
Cloreto de cálcio	0,193 g
Cloreto de potássio	0,2325 g

Tabela 5. Componentes da solução de minerais.

Componentes	Quantidade
Água Milli-Q	500 mL
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	1,5 g
Sulfato de Manganês II	0,25 g
Cloreto de Sódio	0,5 g
Sulfato de Ferro II	0,05 g
Cloreto de Cobalto II	0,05 g
Cloreto de Cálcio	0,05 g
Sulfato de Zinco II Heptahidratado	0,05 g
Sulfato de Cobre II	0,005 g
Sulfato duplo de Alumínio e Potássio	0,005 g
Ácido Bórico	0,005 g
Molibdato de Sódio Dihidratado	0,005 g
Cloreto de Níquel II Hexahidratado	0,005 g

Tabela 6. Componentes da solução de vitaminas.

Componentes	Quantidade
Água Milli-Q	100 mL
Tiamina	90 mg
Inositol	40 mg
Pantotenato de cálcio	4 mg
Ácido p-aminobenzóico (PABA)	5 mg
Vitamina B ₁₂	5 mg
Piridoxina	4 mg
Niacina	0,1 mg
Ácido fólico	0,04 mg

4.3 Microscopia óptica

Alíquotas de 2 μ L da cultura de células foram observadas através da técnica da gota pendente (Figura 12) em microscópio óptico com contraste interferencial diferencial (DIC, do inglês *differential interference contrast*) (ZEISS AxioImager D2) acoplado com câmeras (AxioCam HRm e AxioCam MRc) (Wenter *et al.*, 2009). Selecionou-se o campo visual na borda da gota, e um ímã foi posicionado ao lado da lâmina e então foi verificada a resposta magnetotática das células.

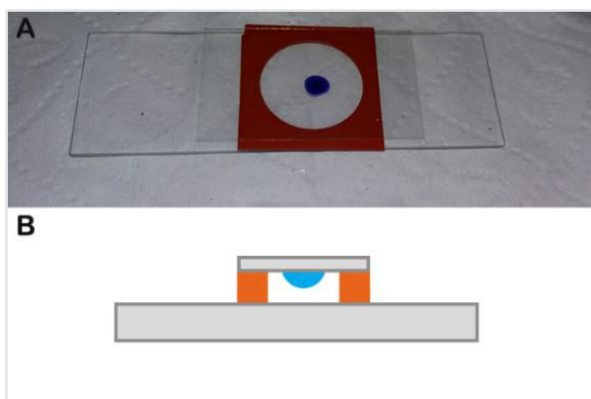


Figura 12. Ilustração da técnica de gota pendente. **A.** Vista topográfica da lâmina preparada. Espaçador (laranja) entre lâmina em lamínula somado ao baixo volume da gota (azul) garante que a mesma esteja pendente. **B.** Esquema mostrando a visão lateral da lâmina preparada. Em azul a gota contendo o espécime que será observado e em laranja a borracha espaçadora que sustenta a lamínula sobre a lâmina.

O comportamento magnetotático foi avaliado ao posicionar o polo norte magnético do ímã voltado para a borda da gota. As células nadaram em direção a borda da gota, ou seja, antiparalelamente ao campo magnético externo gerado. No momento em que rotacionou-se o ímã, a polaridade foi invertida para o sul magnético e então as bactérias então nadaram em direção oposta à borda da gota, isto é, nadaram paralelamente ao campo magnético externo gerado.

4.4 Purificação das partículas virais

A garrafa de cultura contendo o crescimento da bactéria *Mf. australis* foi aberta e o volume distribuído em tubos de polipropileno de 50 mL, para posterior centrifugação a 7197 g (Centrifuge 5430R; Eppendorf) durante 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de policarbonato com porosidade de 0,22 μm . O sobrenadante filtrado foi transferido para 6 tubos 45Ti de policarbonato (REF: 355622; Beckman Coulter). Os tubos foram ultracentrifugados a 100.000 g durante 1 hora (Ultracentrífuga Optima LE-80K; Beckman Coulter). Para ressuspender o após a centrifugação, foi adicionado 200 μL de tampão k36 estéril (pH 7,0) (Tabela 7) e a amostra foi agitada a uma rotação de 50 rpm *overnight* a uma temperatura de 4 °C. O conteúdo dos tubos foi recuperado e guardado a 4°C.

Tabela 7. Componentes do tampão k36.

Componentes	Quantidade
Água Milli-Q	500 mL
Cloreto de potássio	0,4383 g
Cloreto de sódio	3,7275 g
Fosfato dipotássico	3,402 g

4.5 Extração de DNA dos fagos purificados

A extração de DNA dos fagos foi realizada como descrito por Higuera *et al.* (2013). Retirou-se 1 mL da amostra contendo fagos purificados e tratou-se com 1 μL de RNase (100 mg/mL – 7000 U/mL) e 4,5 μL de DNase (1 U/ μL). Após o tratamento, a amostra foi incubada por 1h a 37 °C em banho maria. Em seguida, foram adicionados 10 μL de proteinase K (50 mg/mL) e a amostra foi incubada a 65 °C durante 15 minutos. Na próxima etapa, foram acrescentados 50 μL de SDS 10% e incubou-se por 45 minutos a 65 °C. Foi adicionado 500 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A amostra foi homogeneizada por inversão dos tubos e, então, centrifugada a 3.000 g durante 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Essa última etapa foi repetida por mais duas vezes. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e ao volume recuperado de 500 μL acrescentou-se 50 μL de acetato de sódio 3M (pH 5) e 1000 μL de isopropanol 100%, seguido de incubação a -20 °C. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 20.000 g por 20 minutos. Lavou-se o *pellet* com 500 μL de isopropanol 100% e centrifugou-se novamente a 20.000 g por 2 minutos. A lavagem foi repetida usando 500 μL de isopropanol 70%. O *pellet* foi secado em um concentrador SpeedVac™ (Savant™; Thermo Fisher; REF: SPD131DDA-115), ressuspendido em 60 μL água Milli-Q estéril e guardado no freezer -20°C. Após a extração de DNA, foi realizada a quantificação de DNA por

espectrofotometria (NanoDrop™ 2000/2000c ThermoFisher), avaliando a pureza (razões de absorvância 260/280 e 260/230) e a quantidade de DNA em ng/μL.

4.6 Reação em cadeia da polimerase

Foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para os seguintes genes: *rrs*, *mamB*, *mamC*, *mamD*, *mamH*, *mamK*, *mamS* e *mms6*. A reação de PCR foi montada utilizando a enzima GoTaq® Green Master Mix (REF: M7122; Promega) segundo as instruções do fabricante. Para a amplificação do gene que codifica o rRNA 16S foram usados os iniciadores universais 27F e 1492R (Lane *et al.*, 1991) e U515F e U806 (Caporaso *et al.*, 2011) (Tabela 8). Os iniciadores para os genes *mamB*, *mamC*, *mamD*, *mamH*, *mamK*, *mamS* e *mms6* foram desenvolvidos de acordo com o genoma da BM *Mf. australis* cepa IT-1 (Araujo *et al.*, 2016) e foram adquiridos na empresa BIONEER (Tabela 9).

Tabela 8. Iniciadores universais utilizado na PCR para o gene que codifica o rRNA 16S.

Nome	Sequência (5'-3')	Amplicon (bp)	Referência
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1465	Lane <i>et al.</i> , 1991
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T		
U515F	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	291	Caporaso <i>et al.</i> , 2011
U806R	GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT		

Tabela 9. Iniciadores usados na PCR para os genes *mam* e *mms6*.

Nome	Sequência (5'-3')	Amplicon (bp)	Referência
mamBF	AAC GCC CTC TTC AAC TGG AG	249 bp	Este trabalho
mamBR	GCC GGA GAT GGA TGA GCT AC		
mamCF	TAA GAC TCC AGC CCC AGA TCC	249 bp	
mamCR	ATA AGG GGT TGG TGT CAC GC		
mamDF	GCG GCA AAT GGG TGT TCT TG	249 bp	
mamDR	ACC TTC ATC ATC ACC AGC GC		
mamHF	AAG AAC CGA CTC CAC ACG TC	249 bp	
mamHR	GGT AAA ACG CAA ACC CGA GC		
mamKF	CCC GAT CAT ATT GCA ACC GC	249 bp	
mamKR	TCT GGC GCA GAA GAT CAA GG		
mamSF	TAA ACC CCC GAC CAT TCA CC	249 bp	
mamSR	AAA ACA ACA CAG CAG GAT GGC		
mms6F	CGT TGC AAA ATG GCG AGT GG	249 bp	
mms6R	CCA GGC TGG TTC CCG AAC		

As reações montadas foram colocadas no termociclador (Eppendorf Mastercycler® Nexus). Para a reação de PCR do gene que codifica o rRNA 16S as configurações do ciclo usadas foram: 95 °C na pré desnaturação durante 2 minutos, para os 35 ciclos repetiu-se 95 °C na desnaturação por 30 segundos, 56 °C no anelamento durante 30 segundos e 72 °C durante a extensão por 2 minutos. A extensão final foi configurada para 72 °C durante 8 minutos e temperatura de manutenção de 4 °C. Enquanto isso, para os genes *mam* e *mms6* foram utilizadas as seguintes configurações: 95 °C na pré desnaturação durante 2 minutos, para os 35 ciclos será repetido 95 °C na desnaturação, 53 °C no anelamento e 72 °C durante a extensão. A extensão final foi configurada para 72 °C durante 8 minutos e temperatura de manutenção de 4 °C.

4.7 Eletroforese em gel de agarose

Foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% com intuito de observar os produtos das PCRs realizadas. O gel foi preparado dissolvendo 0,3 g de agarose em 30 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE; Tabela 10) aquecido. O gel foi corado usando 3 µL de SYBR SafeDNA Gel Stain (Invitrogen; REF: S33102) e corrido em tampão TAE 1x. As condições da eletroforese foram $U_s = 80$ V e $I_s = 350$ mA durante 40 minutos. Como padrão de peso molecular foi utilizado 1kb DNA Ladder (Promega). Após o final da corrida o gel foi revelado no transiluminador (Transilluminator L-PIX; Locus Biotecnologia).

Tabela 10. Componentes do tampão TAE 1x.

Componentes	Quantidade
Água destilada	993,574 mL
EDTA	0,372 g
Tris base	4,844 g
Ácido acético	1,21 g

4.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Para observar as partículas virais purificadas a partir da cultura da BM *Mf. australis* cepa IT-1 foi utilizada a técnica de contrastação negativa (Brenner e Horne, 1959). Foi adicionada uma alíquota de 5 µL da amostra de fagos purificados sobre a superfície de uma grade de cobre revestida com filme suporte de Formvar (resina vinílica) e carbono. Após um minuto de secagem ao ar o excesso de amostra foi secado cuidadosamente com papel filtro. A amostra foi contrastada negativamente com 5 µL de acetato de uranila 2% por 30 segundos. O excesso de contrastante foi seco com papel filtro. Essas grades foram observadas no microscópio eletrônico de

transmissão Tecnai F20 FEG (FEI Company) operado com voltagem de aceleração de 200 kV. A partir das imagens obtidas, foi medido o diâmetro médio das partículas virais utilizando-se o software iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions; OLYMPUS). Desvio padrão e média foram calculados com base nestes dados.

4.9 Citometria de fluxo

Foram realizadas duas preparações para análise pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) com laser de argônio 488 nm refrigerado a ar, operado a 20 mW e com *nozzle* de 70 μm . Essas amostras foram: (i) a cultura da bactéria *Mf. australis* cepa IT-1 após 4 semanas de crescimento e (ii) a amostra de fagos purificados. As amostras foram fixadas em glutaraldeído na concentração final de 0,5%, em seguida incubada a 4°C por 10 minutos e coradas com SYBR Green I na concentração final de 5×10^{-4} (Invitrogen; REF: S7563). O sinal detectado corresponde a fluorescência emitida pela amostra e o espalhamento lateral (*side scatter*; SC) com ângulo de 90° resultado da interação da luz com a amostra a um fluxo de 43,07 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Junger *et al.*, 2017). As amostras foram diluídas para que sejam lidos de 200 a 800 eventos/segundo a fim de garantir a precisão da leitura evitando eventos sobrepostos e coincidência eletrônica. Microesferas fluorescentes de látex (Fluoresbrite YG carboxylate 1.0 μm , Polysciences) foram usadas para calibrar o equipamento e água Milli-Q estéril (18,2 m Ω) foi utilizada como o padrão de branco do equipamento (Cabral *et al.*, 2017). Foram analisadas amostras de 5 cultivos de experimentos independentes (L1, L2, L3, L4 e L5) e lidas em quintuplicata. Desvio padrão e média foram calculados com base nestes dados.

5. Resultados

5.1 Predição de profagos em BMs

Foram preditas sequências de profagos em 20 das 30 bactérias analisadas utilizando a ferramenta PHASTER (Arndt *et al.*, 2017). Estes profagos estão descritos de forma resumida na Tabela 11. Em Alphaproteobacteria, foram encontradas sequências de profagos intactos, questionáveis e incompletos nos espirilos magnetotáticos *Ms. magneticum* cepa AMB-1, *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1, *Ms. caucaseum* cepa SO-1, *Ms. magnetotacticum* cepa MS-1 e *Ms. sp.* cepa XM-1. Também foram encontradas sequências de profagos intactos, questionáveis e incompletos nos cocos magnetotáticos pertencentes a classe *Ca. Etaproteobacteria*: *Ca. Mc. massalia* cepa MO-1, *Mc. marinus* cepa MC-1 e *Mf. australis* cepa IT-1. Cocos magnetotáticos aparentam, a princípio, conterem maior número de sequências intactas e questionáveis de profagos.

Na classe Deltaproteobacteria, somente 1 profago intacto foi encontrado pertencendo ao MMP *Ca. Magnetoglobus multicellularis* cepa Araruama. Em *Ds. magneticus* cepa RS-1 foi encontrado 1 profago questionável ocupando metade de um de seus 2 plasmídeos. Dentro dos filos Nitrospirae e Omnitrophica não foram encontradas quaisquer sequências intactas, porém algumas sequências questionáveis de profagos foram preditas em *Ca. Magnetoovum chiemensis* cepa CS-04, *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1 e *Ca. Omnitrophus magneticus* cepa SKK-01. O número real de profagos nos filos Nitrospirae e Omnitrophica e na classe Deltaproteobacteria podem estar subestimados, visto a maior parte dos representantes destes grupos são estudados por técnicas independentes de cultivo. Dessa forma, apenas a deltaproteobactéria *Ds. magneticus* cepa RS-1 é cultivada e têm seu genoma fechado.

Tabela 11. Número e classificação de profagos preditos em BMs pelo PHASTER (Arndt *et al.*, 2017).

Grupo filogenético	BM	Número de profagos			Total
		Intactos	Questionáveis	Incompleto	
Alpha-	<i>Magnetospirillum magneticum</i> cepa AMB-1	-	1	5	34
	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> cepa MSR-1	-	1	2	
	<i>Magnetospirillum caucaseum</i> cepa SO-1	1	1	4	
	<i>Magnetospirillum</i> sp. cepa XM-1	1	1	5	
	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> cepa MS-1	-	1	2	
	<i>Magnetospira tiophila</i> cepa QH-2	-	-	1	
	<i>Magnetospirillum</i> cepa ME-1	-	-	2	
	<i>Magnetovibrio blakemorei</i> cepa MV-1	2	-	3	
	<i>Ca. Terasakiella magnetica</i> cepa PR-1	-	-	1	
<i>Ca. Eta-</i>	<i>Magnetofaba australis</i> cepa IT-1	3	4	3	27
	<i>Ca. Magnetococcus massalia</i> cepa MO-1	-	2	3	
	<i>Magnetococcus marinus</i> cepa MC-1	5	3	4	
Delta-	<i>Desulfovibrio magneticus</i> cepa RS-1	-	1	4	13
	<i>Ca. Desulfamplus magnetomortis</i> cepa BW-1	-	-	3	
	<i>Ca. Magnetoglobus multicellularis</i> cepa Araruama	1	-	2	
	<i>Desulfovibrio</i> cepa DV	-	-	2	
Nitrospirae	<i>Ca. Magnetoovum chiemensis</i> cepa CS-04	-	1	1	7
	<i>Ca. Magnetominusculus xianensis</i> cepa HCH-1	-	1	1	
	<i>Ca. Magnetobacterium bavaricum</i> cepa TM-1	-	-	1	
	<i>Ca. Magnetobacterium casensis</i> cepa MYR-1	-	-	2	
Omnitrophica	<i>Ca. Omnitrophus magneticus</i> cepa SKK-01	-	1	4	5

Foram encontradas em maior número sequências de profagos em BMs da classe Alphaproteobacteria, seguido das classes *Ca. Etaproteobacteria* e Deltaproteobacteria e, posteriormente, dos filos Nitrospirae e Omnitrophica (Figura 13A). Não foram encontradas sequências em dados metagenômicos de BMs dos filos Planctomycetes e Latescibacteria. Profagos questionáveis e incompletos foram encontrados em todos os táxons de BMs descritas na literatura. Estas sequências de profagos pertencem as famílias Siphoviridae, Myoviridae e Podoviridae, da ordem Caudovirales, e da família Inoviridae (Figura 13B). Também foram encontradas sequências de profagos que ainda não foram classificados em nenhuma família ou ordem de vírus. A família Siphoviridae contém o maior número absoluto de sequências dentre as BMs enquanto a família Myoviridae está presente em todas as classes e filos de BMs já descritas. A classe Alphaproteobacteria é a que possui, até o momento, maior número de BMs descritas e possui o maior número absoluto de profagos encontrados (Figura 13B). A classe *Ca. Etaproteobacteria*, de cocos magnetotáticos, possui apenas 3 BMs descritas até o momento, no entanto é o segundo grupo filogenético de BMs a conter maior número absoluto de sequências

de profagos preditas e o maior grupo filogenético que contém sequências intactas de profagos (Figura 13A). Nesta classe foram encontradas sequências pertencentes as 3 famílias da ordem Caudovirales: Myo-, Sipro- e Podoviridae (Figura 13B). No filo Nitrospirae foram preditas sequências de profagos das famílias Sipro- e Myoviridae, da ordem Caudovirales, correspondente a fagos caudados dsDNA. Também foi predita 1 sequência de profago incompleto de morfologia filamentosa pertencente à família Inoviridae (Figura 13B).

Profagos preditos em sequências de metagenoma obtidas por Lin *et al.*, 2018 também foram analisados (Tabela 12). Encontrou-se 5 profagos intactos, 7 profagos questionáveis e 30 profagos incompletos na classe candidata Etaproteobacteria (Tabela 12). As sequências obtidas foram utilizadas para dar maior robustez a análise filogenética de profagos intactos em cocos magnetotáticos presentes na *Ca. Etaproteobacteria* (Figura 15). Encontrou-se 2 sequências de profagos questionáveis e 12 profagos incompletos no filo Nitrospirae (Tabela 12). As sequências obtidas foram utilizadas para dar maior robustez a análise filogenética dos profagos questionáveis no filo Nitrospirae (Figura 15).

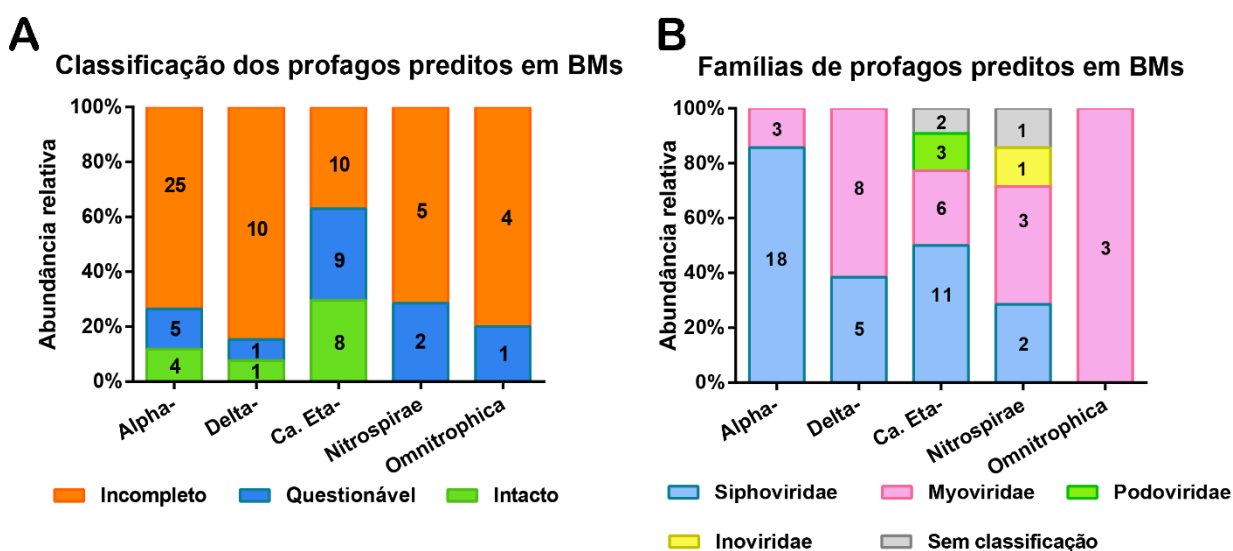


Figura 13. Profagos preditos em BMs utilizando a ferramenta PHASTER (Arndt *et al.*, 2017). **A.** Classificação dos profagos preditos em BMs. **B.** Famílias de profagos preditos em BMs. Cada barra contém o número absoluto de sequências.

Tabela 12. Número e classificação de profagos preditos pelo PHASTER (Arndt *et al.*, 2017) em sequências recuperadas por metagenoma. Sequências obtidas por Lin *et al.*, 2018.

Grupo filogenético	Sequência metagenômica	Número de profagos			Total
		Intactos	Questionáveis	Incompleto	
Ca. Eta-	DC0425bin3	-	-	7	42
	DCbin2	-	1	2	
	DCbin4	-	-	1	
	ER1bin7	1	-	5	
	HA3dbin1	-	-	1	
	HA3dbin3	1	1	1	
	HAA3bin1	-	1	2	
	HCHbin5	1	2	7	
	WMHbin1	-	-	2	
	WMHbin3	1	1	-	
	WMHbinv6	-	1	1	
YD0425bin7	1	-	1		
Nitrospirae	DC0425bin1	-	-	2	14
	HCHbin1	-	1	1	
	MYbin2	-	-	4	
	MYbin3	-	-	3	
	MYbin6	-	1	-	
	MYbinv3	-	-	2	

5.2 Filogenia de profagos encontrados em BMs

Utilizando a ferramenta VICTOR (do inglês *Virus Classification and Tree Building Online Resource*) (Meier-Kolthoff e Göker, 2017) foram inferidas relações evolutivas entre as sequências de profagos preditas em BMs. Os nomes foram reduzidos para o nome da cepa da BM seguidos pelo nome do fago e o número de acesso entre parênteses. Em algumas análises foram incluídos profagos preditos de sequências de metagenoma de BMs (Lin *et al.*, 2018) com o objetivo de dar maior robustez as análises. VICTOR (Meier-Kolthoff e Göker, 2017) é uma plataforma online que otimiza a combinação de parâmetros GBDP (do inglês *Genome Blast Distance Phylogeny*), analisado a nível de nucleotídeo e aminoácidos com objetivo de render o maior número de taxa suportados como monofiléticos. São levadas em consideração o conteúdo completo e organização do genoma fágico indicando que fagos com proximidade filogenética podem utilizar sistemas de infecção e excisão do genoma parecidos. Dessa forma, as sequências foram renomeadas seguindo o padrão: (i) primeiro o nome da cepa de BM, *e.g.* “MC-1”; (ii) traço sublinhado separando o nome do bacteriófago indicado pelo PHASTER (Arndt *et al.*, 2017) em seguida, *e.g.* “Ralstonia phage RS138” e (iii) por último, entre parênteses, o número de acesso da sequência do bacteriófago.

Para a análise filogenética dos fagos preditos nos filios Nitrospirae e Omnitrophica foram utilizadas sequências pontuadas como questionáveis, uma vez que não foram encontradas sequências de profagos intactos nestes filios (Figura 14). Destas sequências, a maior parte pertence à família Siphoviridae. Sequências de profagos de um ponto de coleta na China nomeado como “HCH” foram recuperadas e dividem o mesmo ramo da evolução. Estes vírus foram preditos a partir da BM *Ca. Magnetominusculus xianensis* cepa HCH-1 (Lin *et al.*, 2017) e a sequência de metagenoma nomeada como “HCHbin” (Lin *et al.*, 2018). Ou seja, o mesmo ponto de coleta em um intervalo de um ano apresentou sequências similares entre si.

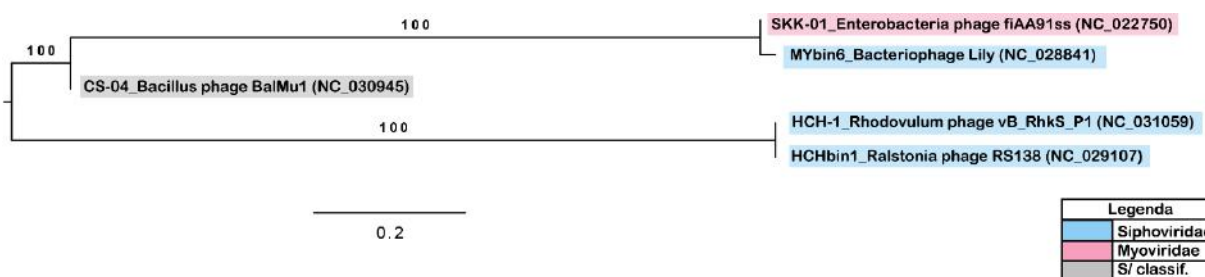


Figura 14. Diversidade filogenética de profagos questionáveis preditos em BMs dos filios Nitrospirae e Omnitrophica. Fagos Rhodovulum vB_RhkS_P1 (NC_0311059) e Ralstonia RS138 (NC_02107) não apresentam divergência evolutiva. Ambos os foram preditos de sequências recuperadas de um ponto de coleta na China (Lin *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018) e foram preditos em sequências recuperadas por técnicas independentes de cultivo. Famílias virais na legenda.

Para o grupo de cocos magnetotáticos foram preditos profagos em sequências recuperadas de metagenoma (Lin *et al.*, 2018) (Tabela 12) a fim de dar maior robustez a análise (Figura 15). Tais dados foram analisados com sequências de profagos preditos nos cocos magnetotáticos: *Mf. australis* cepa IT-1, *Mc. marinus* cepa MC-1 e *Ca. Mc. massalia* cepa MO-1. Os fagos encontrados em *Mf. australis* cepa IT-1 agrupam-se em *clusters* próximos e não dividem proximidade evolutiva com fagos preditos em *Mc. marinus* cepa MC-1, embora esta seja a BM filogeneticamente mais próxima descrita na literatura (Morillo *et al.*, 2014).

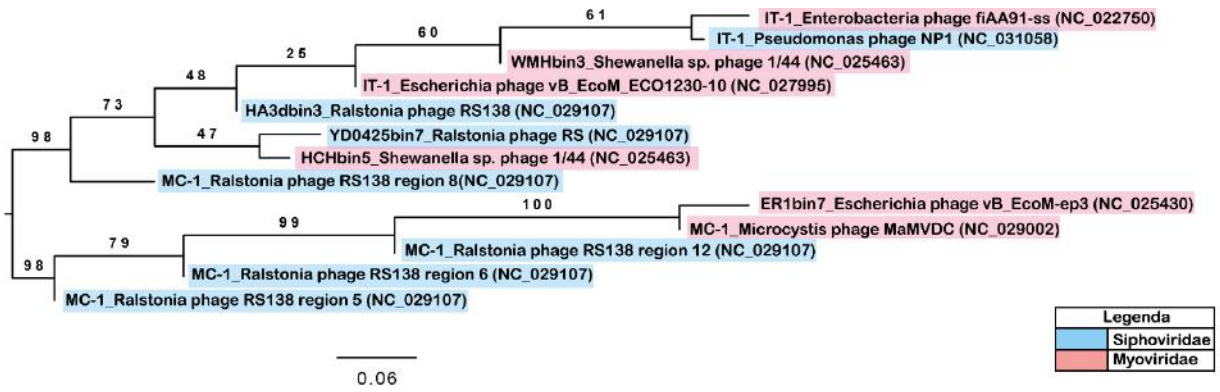


Figura 15. Diversidade filogenética de profagos intactos em cocos magnetotáticos. Profagos preditos a partir de sequências obtidas por metagenoma (Lin *et al.*, 2018) utilizando PHASTER (Arndt *et al.*, 2017) foram adicionadas para dar maior robustez a análise. Famílias virais na legenda.

Dentro do filo Proteobacteria os profagos preditos em *Mf. australis* cepa IT-1 continuam a se agrupar em um *cluster* distante dos profagos preditos na BM mais próxima filogeneticamente, a alfaproteobactéria *Mc. marinus* cepa MC-1 (Figura 16). Sequências de fagos de *Microcystis* preditas em *Mc. marinus* cepa MC-1 (NC_029002) e *Mv. blakemorei* cepa MV-1 (NC_008562) dividem um ancestral comum.

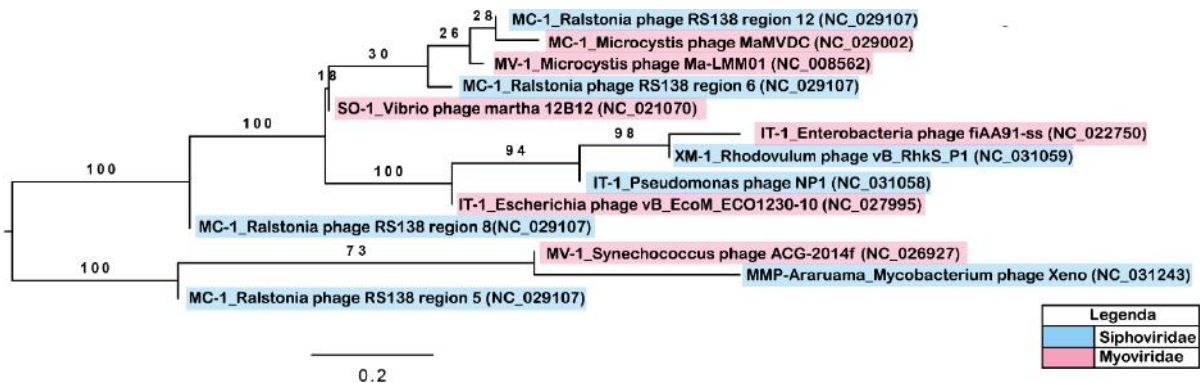


Figura 16. Diversidade filogenética de profagos intactos em bactérias magnetotáticas. Fagos de *Mf. australis* cepa IT-1 dividem um ancestral comum entre si e se agrupam em um *cluster* distante dos fagos da BM filogeneticamente mais próxima, *Mc. marinus* cepa MC-1. Famílias virais na legenda.

5.3 Cultivo da BM *Mf. australis* cepa IT-1 e observação do comportamento magnetotático

As células de *Mf. australis* cepa IT-1 foram crescidas em meio líquido sob microaerofilia e o crescimento foi acompanhado ao longo de 6 semanas (Figura 17). Após 3 semanas observa-se o crescimento microbiano através da formação de uma faixa branca característica (Figura 17A; seta preta) na interface *headspace*-líquido. A altura desta faixa no líquido varia de acordo com a quantidade de gás oxigênio injetada diariamente para manter o crescimento sob microaerofilia. Após 6 semanas o cultivo foi interrompido e foram retiradas alíquotas para as análises a serem realizadas (Figura 17B).

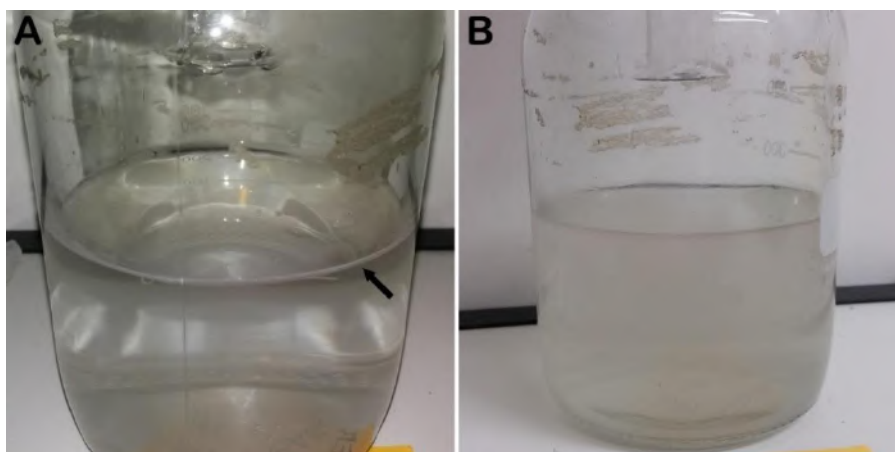


Figura 17. Crescimento de *Mf. australis* cepa IT-1 em meio líquido. **A.** Crescimento em meio líquido sob condição de microaerofilia após 3 semanas do inóculo. As células crescem formando uma banda (seta preta) que se desloca verticalmente de acordo com a quantidade de O₂ injetada diariamente no meio. **B.** Crescimento após 6 semanas. O crescimento não se apresenta mais em forma de banda e passa a ocupar todo o volume de líquido na garrafa.

Após o cultivo ser interrompido, a avaliação da resposta magnetotática da BM *Mf. australis* cepa IT-1 mostrou células respondendo ao campo magnético externo gerado pelo ímã posicionado na platina do microscópio óptico (Figura 18A). Em seguida, as células são visualizadas em maior aumento (Figura 18B) elucidando a sua morfologia cocóide/ovóide e ausência de contaminação.

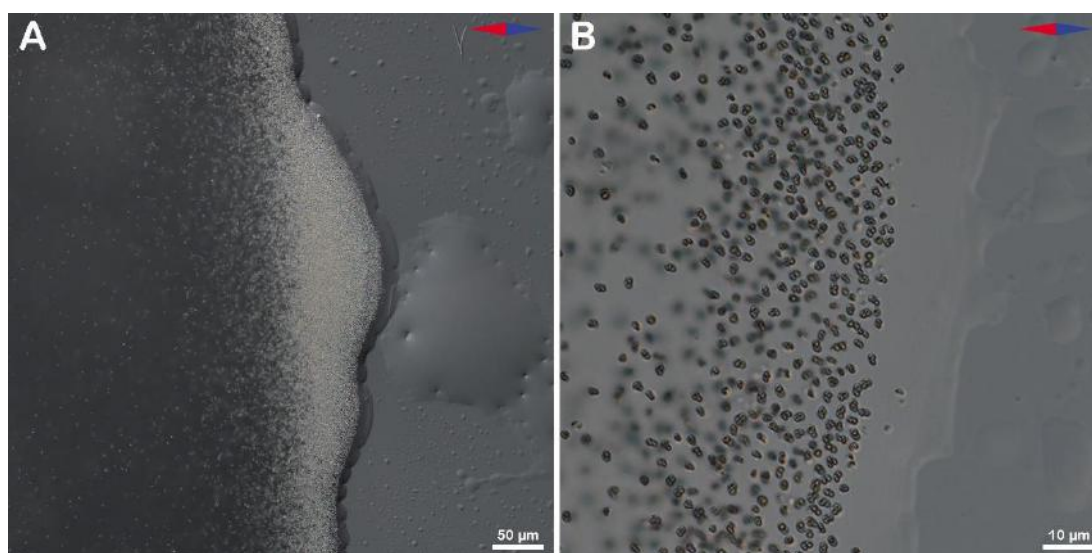


Figura 18. Observação do comportamento magnetotático da BM *Mf. australis* cepa IT-1 por microscopia de DIC. **A.** As células estão nadando de forma antiparalela ao campo magnético externo gerado pelo ímã que se concentrando na borda da gota. **B.** Observação em maior aumento dessas bactérias confirmando a morfologia cocóide/ovóide. O Norte magnético está representado em vermelho e o Sul magnético está representado em azul.

5.6 Diferenciação e quantificação de populações por citometria de fluxo

Dentre as amostras preparadas para a citometria de fluxo, foram retiradas alíquotas em duas condições diferentes: um primeiro no qual foram retiradas alíquotas somente da cultura de células bacterianas e em um segundo momento no qual foram retiradas alíquotas do purificado de partículas virais. Quando a cultura de células (Figura 19A) foi analisada no citômetro, foram observadas duas populações distintas, isto é, uma população de bactérias demarcada em vermelho e uma população de que se supõe que sejam partículas virais, demarcadas em azul, produzidas pela própria bactéria. Ao passo que, quando observamos o resultado da purificação de partículas virais apenas observamos uma população demarcada em azul, a suposta população de bacteriófagos purificados (Figura 19B). Calibração feita com esferas de látex demarcado em verde (Figura 19A e B).

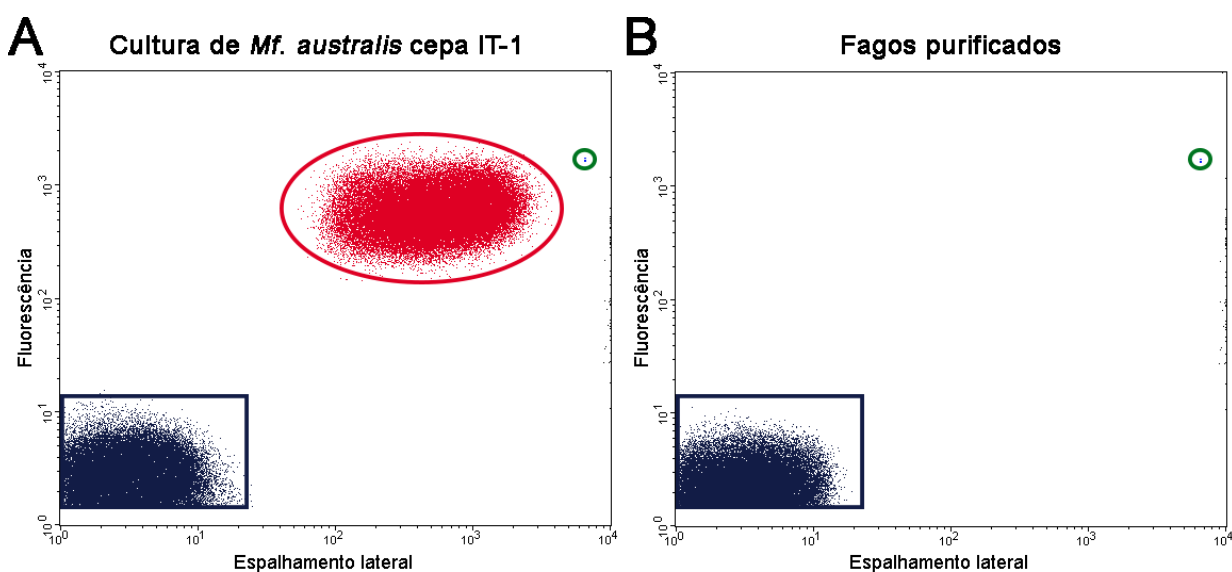


Figura 19. Perfil populacional por citometria de fluxo. **A.** Cultura de células bacterianas analisada no citômetro. Podemos observar duas populações diferentes: bactérias (vermelho) e fagos (azul). Foram quantificadas $5,5 \times 10^5$ bactérias/mL e $2,3 \times 10^7$ partículas virais/mL. **B.** Após a purificação das partículas virais apenas observamos a população de partículas virais em uma concentração de $7,53 \times 10^7$ partículas virais/mL. Esferas de látex (EL) usadas para calibração estão em verde.

A partir dessas observações, foram quantificados o número de eventos a fim de tomar conhecimento das proporções de vírus e bactéria na amostra. Essa observação e quantificação foi possível graças a marcação dos ácidos nucleicos tanto da bactéria quanto das partículas virais (Figura 20). Na condição na qual foram lidos os eventos da cultura bacteriana, obteve-se $5,54 \pm 1,48 \times 10^5$ bactérias/mL e $22,82 \pm 3,86 \times 10^6$ partículas virais/mL ao passo que após a purificação das partículas obteve-se $7,53 \pm 0,96 \times 10^6$ partículas virais/mL (Figura 20A). A proporção entre

o número de fagos e o número de bactérias também foi determinado, chegando ao valor médio de $46,9 \pm 17,5$ partículas virais por bactéria (Figura 20B).

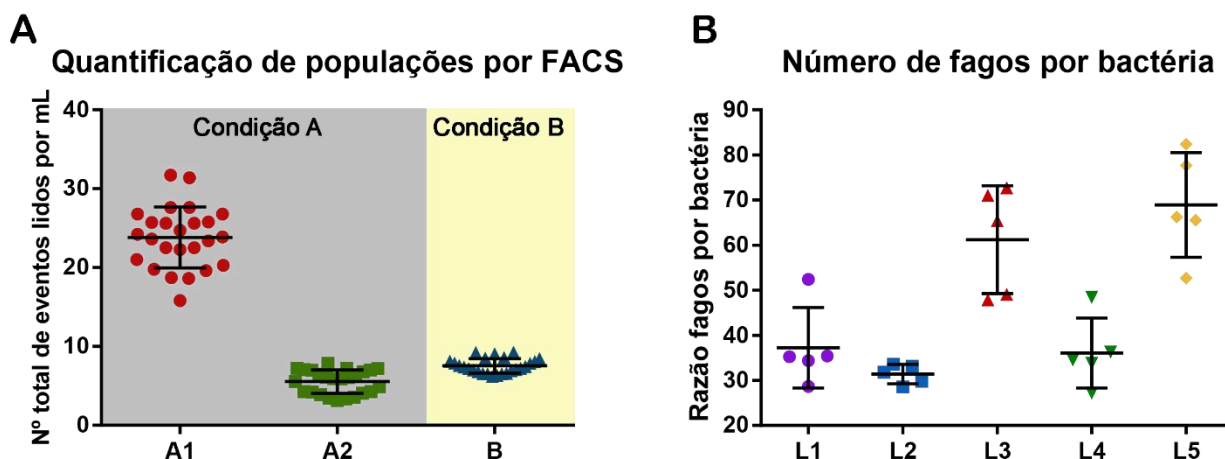


Figura 20. Quantificação das populações por citometria de fluxo. **A.** Quantificação de populações por FACS. São descritas duas populações para quantificação: fagos e bactérias. Na condição A, a amostra retirada do cultivo bacteriano, obteve-se $22,82 \pm 3,86 \times 10^6$ fagos/mL e $5,54 \pm 1,48 \times 10^5$ bactérias/mL. Na condição B, quando os fagos foram purificados, obteve-se $7,53 \pm 0,96 \times 10^6$ partículas virais/mL. **B.** Número de fagos por bactéria. Foram feitas 5 leituras (n=5), em quintuplicata, em 5 experimentos independentes (L1, L2, L3, L4 e L5) e obteve-se o valor médio de $46,9 \pm 17,5$ fagos por bactéria.

5.4 Observação das partículas virais por MET

O sobrenadante da cultura líquida de *Mf. australis* cepa IT-1 foi processado para purificação de partículas virais como consta em no item “4.4 Purificação de partículas virais” e então foi realizada a contrastação negativa. Através dessa técnica e posterior observação no MET, é possível observar estruturas semelhantes a fagos presentes em nossa cultura de *Mf. australis* cepa IT-1 (Figura 21). Devido à provável presença de envelope viral torna-se mais difícil a visualização da morfologia das partículas virais. O envelope dificulta a deposição do contrastante entre as proteínas do capsídeo, fazendo com que o acetato de uranila se deposite majoritariamente em volta do vírus. Em vírus não envelopados o contrastante se deposita em depressões formadas pelas proteínas do capsídeo e estas têm sua visualização facilitada. O diâmetro médio das partículas foi medido no software iTEM e obteve-se $101,9 \pm 10,3$ nm (n=20) (Figura 22).

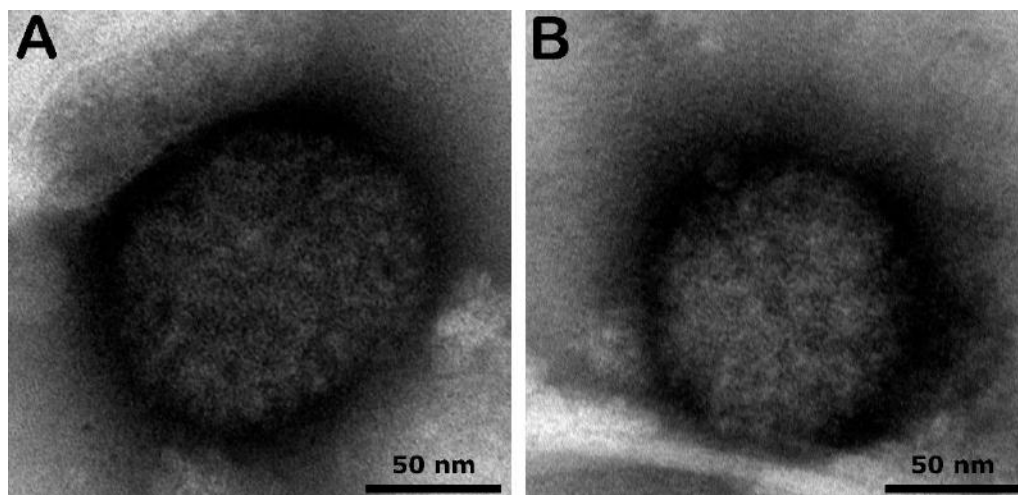


Figura 21. A. e B. Bacteriófagos provavelmente envelopados observados por MET. A morfologia viral é de difícil elucidação devido a provável presença de envelope que dificulta a penetração do contraste na amostra.

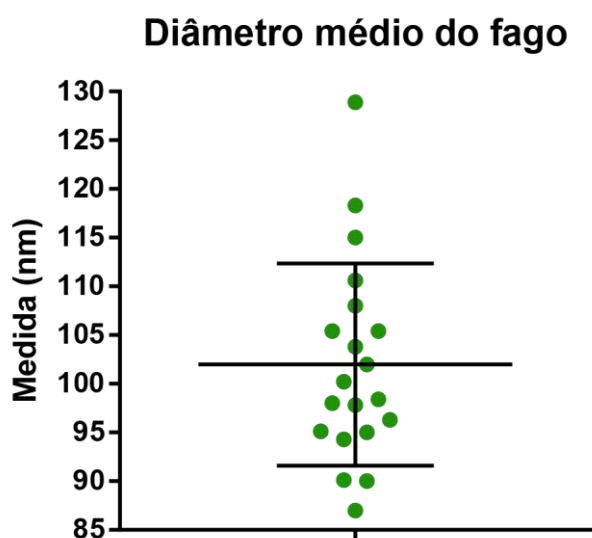


Figura 22. Diâmetro médio do fago. As partículas virais possuem diâmetro médio de $101,9 \pm 10,3$ nm (n=20).

5.5 Amplificação de genes de biomineralização e gene que codifica o rRNA 16S

Para realizarmos qualquer análise sobre o genoma do bacteriófago, o DNA extraído deveria conter apenas o genoma das partículas virais, sem nenhum contaminante bacteriano. Para isso a amplificação por PCR do gene que codifica o rRNA 16S foi realizada com dois pares de iniciadores diferentes, gerando *amplicons* de tamanhos diferentes (Figura 23). Na Figura 23A foram utilizados os iniciadores universais 27F e 1492R (Lane ,1991) que resultam em um *amplicon* de 1465 pares de base. Apenas obtivemos amplificação em nosso controle positivo, no

qual foi utilizado DNA de *Mf. australis* cepa IT-1 como molde. O controle negativo não apresentou amplificação, garantindo que a PCR não estava contaminada. A amostra de DNA extraído do fago também não apresentou amplificação para o gene que codifica o rRNA 16S, garantindo que não houve contaminação bacteriana na nossa amostra. Na Figura 23B foi realizada outra PCR para o gene que codifica o rRNA 16S, porém utilizando os iniciadores U515F e U806R (Caporaso *et al.*, 2011) que resultam em um *amplicon* de 291 pares de base. Tal tamanho do *amplicon* foi escolhido para detectar possíveis fragmentos de DNA bacteriano que estivessem presentes em nossa amostra e garantir um tamanho parecido com os *amplicons* gerados pelos iniciadores de genes que codificam proteínas Mam e Mms.

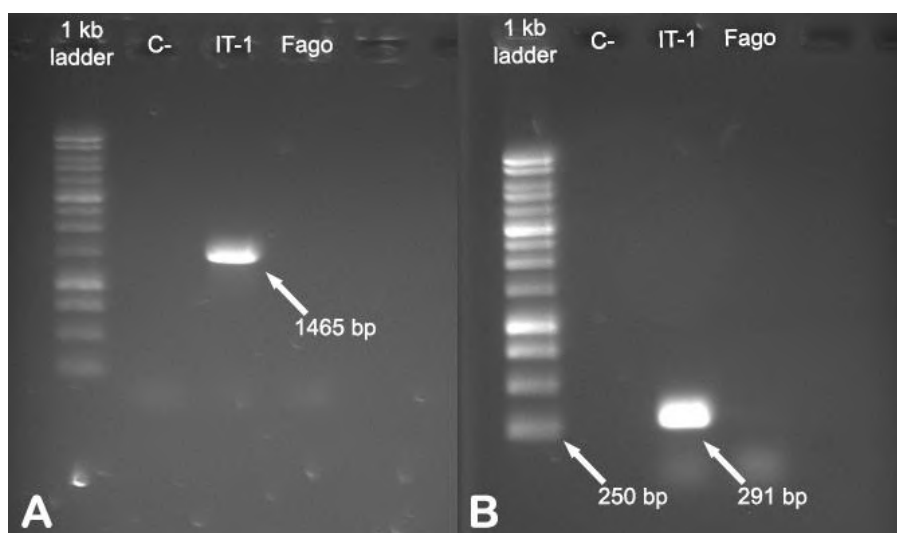


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose do resultado da PCR para o gene que codifica o rRNA 16S. **A.** Utilizando os iniciadores universais 27F e 1492R obteve-se um *amplicon* de cerca de 1465 pares de base. O controle negativo não amplificou, como esperado; o controle positivo, o DNA extraído d BM *Mf. australis* cepa IT-1, amplificou como esperado segundo o tamanho de 1465 pares de base (setas); e o DNA extraído de fagos não

amplificou, garantindo que não há DNA bacteriano na amostra. **B.** Utilizando os iniciadores universais U515F e U806R obteve-se um *amplicon* de 291 pares de base. O controle negativo não amplificou, como esperado; o controle positivo, o DNA extraído da BM *Mf. australis* cepa IT-1, amplificou como esperado segundo o tamanho de 1465 pares de base (setas); e o DNA extraído de fagos não amplificou, garantindo que não há contaminação com DNA bacteriano na amostra.

Abaixo, na figura 24, foi feita a PCR para os seguintes genes: *mamB*, *mamC*, *mamD*, *mamH*, *mamK*, *mamS* e *mms6*. A coluna “C-” representa o controle negativo empregado para cada par de iniciadores, a coluna “IT-1” representa a PCR da amostra de DNA extraída de *Mf. australis* cepa IT-1, funcionando como controle positivo para a detecção destes genes. A coluna “Fago” representa justamente a PCR da amostra de DNA extraído dos bacteriófagos. Todos os controles negativos e positivos funcionaram de acordo com o esperado, tendo apenas uma baixa amplificação para o gene *mamC* no controle positivo que pode ter ocorrido devido a eficiência dos iniciadores não ter sido boa. Todos os *amplicons* foram desenhados para terem 249 pares de base. Para os genes *mamB*, *mamC*, *mamD*, *mamK*, *mamH* e *mamK* houve amplificação na amostra que contém o DNA extraído do purificado de partículas virais, indicando que estes genes de alguma forma estão presentes no material genético analisado (Figura 24). Para os genes *mamS*

e *mms6* não houve amplificação na amostra contendo o DNA do fago, o que sugere que tais genes não estão presentes na amostra de DNA extraído dos bacteriófagos (Figura 24).

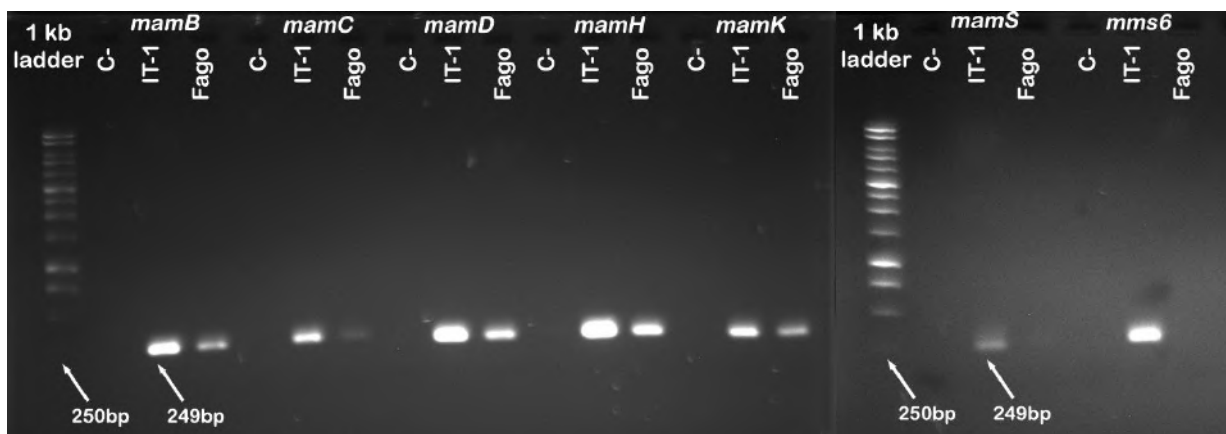


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para os genes *mamB*, *mamC*, *mamD*, *mamH* e *mamK*, *mamS* e *mms6*. Todos os controles negativos (C-) não amplificaram, como esperado; todos os controles positivos (IT-1) amplificaram com o tamanho esperado – 249 pares de base; e quase todos os genes para o DNA de bacteriófago, exceto *mamC*, geraram *amplicons* no tamanho esperado – 249 pares de base (setas). Padrão de peso molecular de 1 kb.

6. Discussão

6.1 Predição e filogenia de profagos em BMs

O estudo de profagos em BMs e a síntese de partículas virais por BMs é inovador visto que nenhum estudo foi publicado exclusivamente sobre o tema. Profagos estão presentes em mais de 60% das sequências de genomas bacterianos depositados no NCBI e quando se trata de BMs já existem alguns estudos que propuseram a presença de profagos no genoma de alguns representantes magnetotáticos. Dentre estes estudos estão a presença de 14 profagos na alfaproteobactéria *Mc. marinus* cepa MC-1 (Schübbe *et al.*, 2009), os quais têm tamanho variando entre 5 de 41 kb e com conteúdo GC entre 52.14 e 58.34% (Schübbe *et al.*, 2009). A predição de profagos neste estudo utilizou a ferramenta Prophage Finder (Bose e Barber, 2006). Profagos incompletos também foram encontrados no genoma dos espirilos magnetotáticos *Ms. gryphiswaldense* cepa MSR-1 e *Ms. magneticum* cepa AMB-1, porém o tamanho nem a organização dos genes dos profagos é descrita no trabalho (Schübbe *et al.*, 2009). Além do trabalho de Schübbe *et al.*, 2009, sequências de profagos também foram preditas nos trabalhos descrevendo as BMs *Ca. Mc. massalia* cepa MO-1 (Ji *et al.*, 2017) e *Magnetospira* sp. cepa QH-2 (Ji *et al.*, 2014). Em *Magnetospira* sp. cepa QH-2 nenhuma sequência de profago foi identificada enquanto em *Ca. Mc. massalia* cepa MO-1 foram preditas 5 sequências de profagos, porém sem maior descrição dos dados obtidos na predição.

Na BM *Mf. australis* cepa IT-1, alvo deste estudo, foram preditos 10 profagos (Toledo, 2016) sendo 3 destes completos e 7 incompletos usando a ferramenta de predição PHASTER (Arndt *et al.*, 2017). O tamanho dos profagos varia entre 10 e 44.5 kb e dentre estes foram associados às famílias *Siphoviridae* e *Myoviridae*. No profago 1, o maior dos profagos, com 40 kb, estão presentes genes que codificam integrase, transposase, proteínas *phage-like* e um sítio de recombinação (*attachment site*).

Após a predição de profagos nos genomas de BMs descritas na literatura (Tabela 1) foi possível perceber que existem sequências de profagos em 20 das 30 bactérias analisadas. Os profagos preditos correspondem a ordem Caudovirales, conhecida por possuir fagos caudados e dupla fita de DNA e a fagos de morfologia filamentosa da família Inoviridae. Dentro da ordem Caudovirales foram encontradas 3 famílias diferentes: *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*. A família *Myoviridae* está presente em todas as classes e filos de BMs descritas. Isso pode sugerir que (i) BMs exibem algum fenótipo não específico que permita a infecção de todas as BMs por

fagos dessa família ou (ii) todos os grupos de BMs sejam suscetíveis a infecções por fagos da família Myoviridae (Molineux e Panja, 2013). Em relação ao número absoluto de sequências, a família Siphoviridae possui o maior número de profagos preditos em BMs (Figura 13B). Profagos da família Siphoviridae foram encontrados em todos os grupos filogenéticos exceto na BM *Ca. Omnitrophus magneticus* cepa SKK-01 do filo Omnitrophica (Figura 13B). No filo Omnitrophica foram encontradas profagos pertencentes a família Myoviridae. A presença dessa família viral corrobora com os dados analisados para outros grupos filogenéticos de BMs e a ausência de profagos da família Siphoviridae pode ser justificada pelo fato de só existir um único representante magnetotático descrito neste filo (Kolinko *et al.*, 2014).

A respeito da diversidade filogenética destes profagos preditos em BMs, ao compararmos a relação evolutiva entre estes vírus, percebemos que: (i) dentre os profagos preditos de sequências de BM do filo Nitrospirae, existem duas sequências que foram recuperadas de BMs por técnicas independentes de cultivo em momentos diferentes (Lin *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018) de um mesmo ponto de coleta e que possuem o mesmo ancestral comum (Figura 15A); (ii) dentro dos cocos magnetotáticos, a BM *Mf. australis* cepa IT-1 têm seus profagos preditos agrupando-se em um *cluster* que divide um ancestral comum relativamente distante dos fagos encontrados no genoma da BM filogeneticamente mais próxima a ela, a etaproteobactéria *Mc. marinus* cepa MC-1 (Figura 15); (iii) dentro do grupo de cocos magnetotáticos, profagos preditos em *Mf. australis* cepa IT-1 dividem ancestrais comuns com profagos preditos em sequências recuperadas por metagenoma a partir de amostras coletadas na China (Lin *et al.*, 2018) (Figura 14); (iv) sequências de profagos preditos nos espirilos magnetotáticos cepas XM-1 e SO-1 aparentam dividir ancestral comum relativamente antigo uma vez que seus fagos se agrupam em *clusters* com *Mf. australis* cepa IT-1 e com as cepas *Mc. marinus* cepa MC-1 e *Mv. blakemorei* cepa MV-1, respectivamente (Figura 16); e (v) o único profago intacto da predito na classe Deltaproteobacteria e entre os MMPs está agrupado no mesmo *cluster* de um fago predito na alfafroteobactéria *Mv. blakemorei* cepa MV-1 (Figura 16).

Essas informações sugerem uma alta diversidade nas sequências de profagos adquiridas por BMs ao longo da evolução (Figura 13A). Tais sequências estão presentes, majoritariamente, na ordem Caudovirales, responsável por conter fagos caudados dupla fita de DNA (Figura 13B). A diversidade destas sequências pode estar subestimada visto que em bancos de dados de sequências de genomas de fagos cerca de 95% corresponde a fagos da ordem Caudovirales (Mavrich e Hatfull, 2017). A diversidade destes vírus ainda é pouco abordada fora dessa ordem

e poucos representantes foram isolados de amostras ambientais e possuem genoma sequenciado (Ofir e Sorek, 2018) (Figura 25). Este último fato corrobora com os resultados encontrados na predição realizada pelo programa PHASTER (Arndt *et al.*, 2017) cuja maior parte das sequências preditas correspondem as famílias Myo-, Siphoviridae e Podoviridae, da ordem Caudovirales (Figura 13B). Uma única sequência fora da ordem Caudovirales foi predita na BM do filo Nitrospirae *Ca. Magnetobacterium casensis* cepa MYR-1, correspondente a um profago de morfologia filamentosa da ordem Inoviridae.

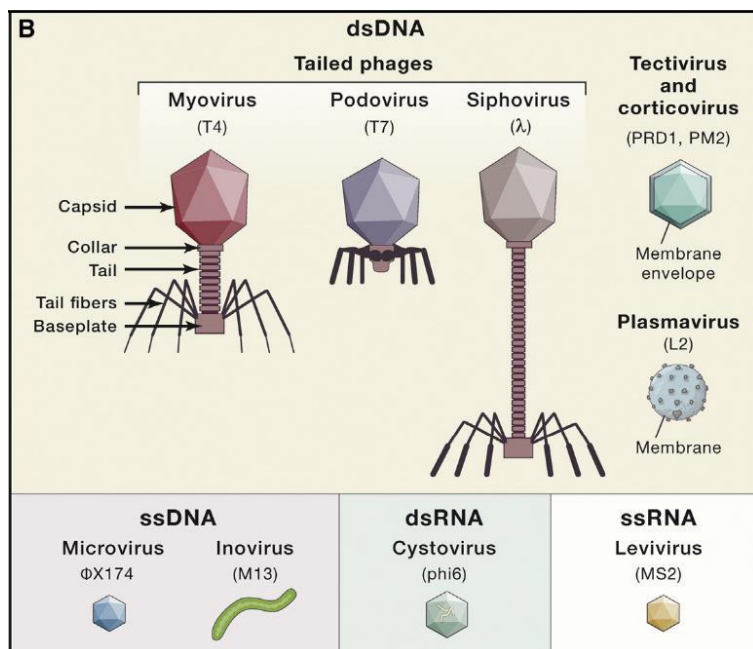


Figura 25. Diversidade de fagos estudados até o momento. Fagos caudados dupla fita de DNA correspondem a 95% das sequências depositadas em bancos de dados (Mavrich e Hatfull, 2017). Fagos podem ter morfologia caudada (Myo-, Podo- e Siphovirus), filamentosa (Inovirus) ou icosaédrica (Mico-, Cysto-, Levi-, Tecti, Cortico- e Plasmavirus). Alguns destes fagos podem possuir envelope oriundo da célula hospedeira (Plasma, Tecti- e Corticovirus). Figura retirada de Ofir e Sorek (2018).

6.2 Bacteriófagos em *Mf. australis* cepa IT-1

Após uma nova predição de profagos no genoma da alfa-proteobactéria magnetotática *Mf. australis* cepa IT-1 (Morillo *et al.*, 2014) indicar a presença de 10 sequências de fagos, investigações sobre estes vírus passaram a ser desenvolvidas. Partículas semelhantes a bacteriófagos já haviam sido observados antes graças a imagens de MEV (Toledo, 2016). Populações virais também já haviam sido identificadas por citometria de fluxo buscando indução do ciclo lítico de fagos em *Mf. australis* cepa IT-1 (Toledo, 2016). Estas partículas foram então purificadas e isoladas para sua caracterização molecular e morfológica.

A BM *Mf. australis* cepa IT-1 é de difícil cultivo em meio líquido e altas densidades celulares são difíceis de serem obtidas. As células crescem em microaerofilia formando uma banda branca (Figura 17). Conforme há o crescimento celular, o oxigênio disponível é consumido e adições diárias do gás são necessárias, visando manter o crescimento bacteriano. Não há um

sistema que purgue o O₂ conforme as necessidades específicas da célula. O processo de adição do gás é feito manualmente na cultura. A adição manual do gás é um processo grosseiro e muitas vezes é adicionado mais do que o necessário para a manutenção do cultivo. Consequentemente, essa adição grosseira e provavelmente excessiva pode desencadear um estresse celular, visto que a célula é microaerófila. É possível que esse estresse ative o ciclo lítico de profagos presentes no genoma da BM *Mf. australis* cepa IT-1. Estudos prévios demonstraram que diversos tipos de estresse podem ativar o ciclo lítico de fagos, concomitando na produção de partículas virais (Erez *et al.*, 2017). Toledo, 2016 induziu o ciclo lítico desses profagos com adição de mitomicina, contudo, em análises por FACS observou-se que tanto na situação controle quanto na indução do ciclo lítico havia partículas virais sendo produzidas (Figura 26). Esse dado corrobora com o fato que partículas virais são produzidas por *Mf. australis* cepa IT-1 em qualquer momento do ciclo celular visto que o estresse diário pode promover a liberação destes fagos.

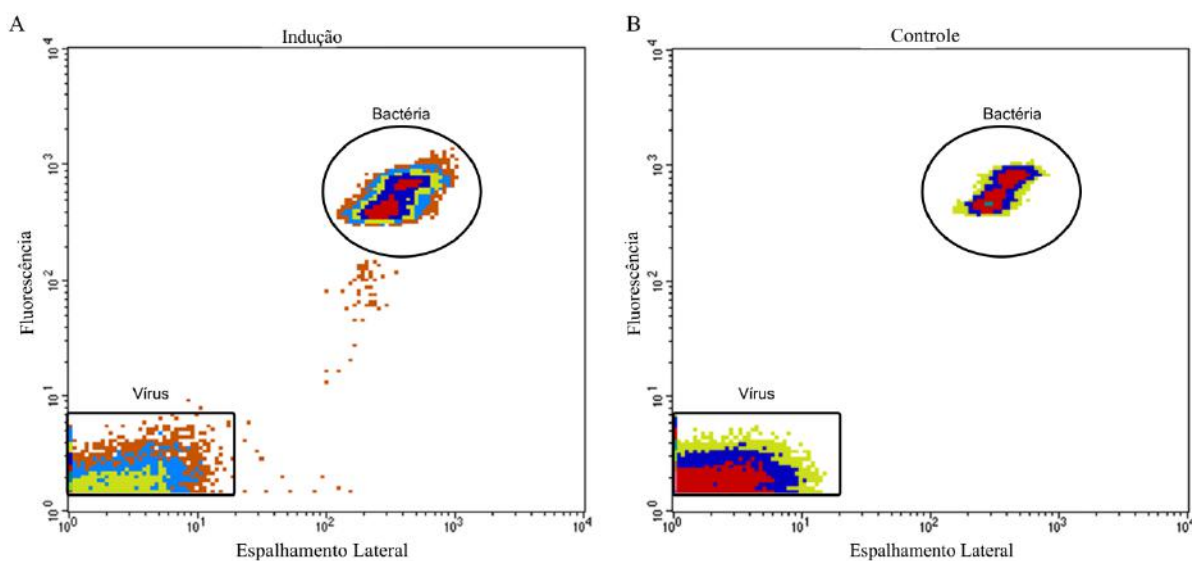


Figura 26. Quantificação de *Mf. australis* cepa IT-1 e partículas virais por citometria de fluxo (Toledo, 2016). **A.** Análise realizada 24 horas após a indução do ciclo lítico viral pela adição de mitomicina C. **B.** Análise realizada 24 horas após o cultivo no meio de cultura líquido para crescimento celular sem a adição de mitomicina C.

Na citometria de fluxo, realizada nesta monografia, foi possível observar duas populações bem distintas de acordo com a marcação para ácidos nucleicos. Foi possível observar que durante o crescimento da bactéria a população de partículas virais encontra-se também presente, sugerindo que estas são produzidas, de alguma maneira, pela BM *Mf. australis* cepa IT-1 de forma constante (Figura 19). Através da etapa purificação das partículas virais conseguimos eliminar de forma eficiente a população celular, restando apenas a população de partículas virais. Essa purificação é importante pois com ela conseguimos maximizar a obtenção das partículas virais, ao invés de trabalharmos apenas com o sobrenadante da cultura.

A análise do purificado de partículas virais por citometria de fluxo resultou em um número menor na quantificação por mL de amostra (Figura 20). A diferença entre a quantificação dos fagos na cultura e no purificado pode ser resultante: (i) da perda de partículas virais durante o processamento para purificação e/ou (ii) da marcação indevida de fagos na condição do cultivo, visto que alguns debris celulares podem ter sido marcados em conjunto, mascarando o número total de vírus quantificados. Na figura 20, resultados da quantificação da população de fagos na cultura (círculos vermelhos) encontram-se mais dispersos e com desvio padrão maior do que a distribuição da população de fagos purificados (triângulos azuis). Na purificação de partículas virais (condição B; triângulos azuis) a quantificação da população resultou em dados mais coesos e próximos, com desvio padrão menor, reforçando a ideia de partículas virais estavam sendo marcadas de fato. Estes dados sugerem que debris celulares podem ter sido marcados também na condição A (Figura 20A). Em respeito a proporção de fagos por bactéria, não foi observado um padrão (Figura 20B). Em 5 experimentos independentes (L1, L2, L3, L4 e L5), a leitura da proporção de fagos por bactéria resultou em diferentes resultados, mesmo as alíquotas tendo sido retiradas com o mesmo tempo de crescimento bacteriano. Isso pode ser um indicativo de que não há uma proporção exata do número de fagos produzidos pelo número de bactérias e que esse número está sujeito a variações de acordo com a condição de cultivo, visto anteriormente.

Um dos aspectos interessantes sobre a produção de partículas virais na cultura de *Mf. australis* cepa IT-1 em meio líquido é que não ocorre o processo de clarificação da cultura, mesmo havendo liberação dos fagos com ou sem indução de ciclo lítico (Figura 26). Isso pode indicar que esses profagos apresentam o comportamento crônico, como descrito por Hobbs e Abedon, 2016. O comportamento crônico foi descrito primeiramente em fagos filamentosos da família Inoviridae e diz respeito a fagos que são liberados de forma constitutiva pelo hospedeiro, sem que haja perda de integridade de membrana. Fagos da família Inoviridae foram caracterizados com liberação por meio de extrusão (Marvin, Symmons e Straus, 2014) e fagos da família Plasmaviridae (Krupovic, 2018). Portanto, é sugerido que os fagos produzidos por *Mf. australis* cepa IT-1 adotam um comportamento crônico visto os pontos discutidos até o momento.

Citometria de fluxo e microscopia eletrônica são técnicas que complementares entre si, na qual os resultados observados por uma técnica podem ser confirmados pela outra. Dito isto, o processamento clássico para material biológico visando a sua observação em MET consiste em sua fixação, inclusão em polímeros e nos respectivos cortes ultrafinos, o que resulta em observações bidimensionais. Quando se trata de estruturas muito pequenas, como o caso das

partículas virais, torna-se indispensável o preparo de amostras íntegras que visem a sua representação tridimensional. Nesse contexto, surge a preparação de amostras pela técnica de contrastação negativa, descrita por Brenner e Horne (1959).

Assim, quando observamos em MET as partículas virais que foram contrastadas negativamente, tais resultados corroboram com as análises de citometria de fluxo. O princípio da técnica consiste na deposição do acetato de uranila ao redor da partícula e não penetra nela de fato. Essa deposição do contrastante permite a observação da morfologia da partícula, isto é, seu contorno. Caso a partícula possua envelope, a deposição do contrastante no capsídeo viral se torna mais difícil devido a presença de uma membrana lipídica. A presença desse envelope atrapalha a elucidação da estrutura do capsídeo. Por fim, o diâmetro médio da partícula se encontra dentro da faixa de tamanho esperada para fagos envelopados como os fagos descritos nas famílias Tectiviridae (San Martín *et al.*, 2002), Corticoviridae (Oksanen e Consortium, 2017) e Plasmaviridae (Kuprovic, 2018).

Embora nas observações por MET o bacteriófago produzido por *Mf. australis* cepa IT-1 possua envelope, este resultado não confere com a predição de profagos realizada pelo PHASTER (Arndt *et al.*, 2017). Os fagos preditos em *Mf. australis* cepa IT-1 correspondem a fagos dsDNA caudados pertencentes as famílias Myo- e Siphoviridae da ordem Caudovirales. Como discutido anteriormente esse resultado pode ser um artefato da predição uma vez que a diversidade destes vírus ainda é pouco abordada fora dessa ordem e poucos representantes foram isolados de amostras ambientais e possuem genoma sequenciado (Ofir e Sorek, 2018). Portanto, o conteúdo majoritário depositado em bancos de dados de fagos corresponde a fagos da ordem Caudovirales (Mavrich e Hatfull, 2017).

6.2 Estudo do papel de profagos na evolução da magnetotaxia utilizando *Mf. australis* cepa IT-1 como modelo

A partir dos dados anteriores, foram observadas populações de fagos por citometria de fluxo e o purificado de partículas virais foi observado por microscopia eletrônica de transmissão como discutido anteriormente. Estas análises contribuem com dados prévios obtidos por Toledo, 2016 para o entendimento de profagos em BMs bem como a produção de fagos por *Mf. australis* cepa IT-1. Logo, é possível estabelecer o modelo celular de *Mf. australis* cepa IT-1 para estudo e análises posteriores envolvendo a produção de bacteriófagos por BMs. Análises moleculares,

a serem discutidas, visaram aumentar o entendimento sobre o papel de fagos como possíveis agentes na evolução de BMs.

Buscando investigar a presença de genes de biomineralização após a purificação dos fagos, foram desenhados 6 pares de iniciadores que abrangem 6 diferentes *operons* que codificam proteínas Mam e Mms de acordo com a sequência do genoma parcial de *Mf. australis* cepa IT-1. Tais genes amplificaram como esperado no DNA extraído de *Mf. australis* cepa IT-1 e, portanto, garantem que o controle positivo funcionou de acordo. Ao usar o DNA fágico como molde, genes de biomineralização foram detectados. São estes: *mamB*, *mam C*, *mamD*, *mamH* e *mamK*. A amplificação por PCR destes genes sugere que a(s) partícula(s) viral(is) produzida(s) pela BM *Mf. australis* cepa IT-1 empacota(m) estes genes de alguma forma durante o processo de montagem da partícula. Os genes *mamS* e *mms6* não foram detectados usando o DNA fágico como molde para amplificação por PCR.

A amplificação dos genes de biomineralização a partir de experimentos independentes revelou que o mesmo conjunto de genes são amplificados no genoma fágico enquanto outros não (Figura 24). Esses dados podem sugerir que há um empacotamento, de forma organizada ou preferencial, destes genes no capsídeo viral. Este empacotamento de somente um grupo de genes de biomineralização pode ser um indício de que o fago realize transdução especializada. Na transdução especializada, regiões franqueadoras ao genoma do profago podem ser carreadas no momento da montagem da partícula viral (Balcazar, 2014). Têm-se o genoma parcial de *Mf. australis* cepa IT-1 (Morillo *et al.*, 2014) e, portanto, algumas informações sobre o genoma podem estar em partes não cobertas pelo sequenciamento. Ao observar a organização dos genes em *Mf. australis* cepa IT-1 (Figura 27) os genes *mamS* e *mms6*, que não foram detectados no genoma do fago, não foi possível inferir se a posição destes genes na ilha do magnetossomo é decisiva ou possui algum papel no não empacotamento destes genes. Maiores investigações sobre o mecanismo e frequência de empacotamento destes genes são necessárias para o melhor entendimento deste processo.

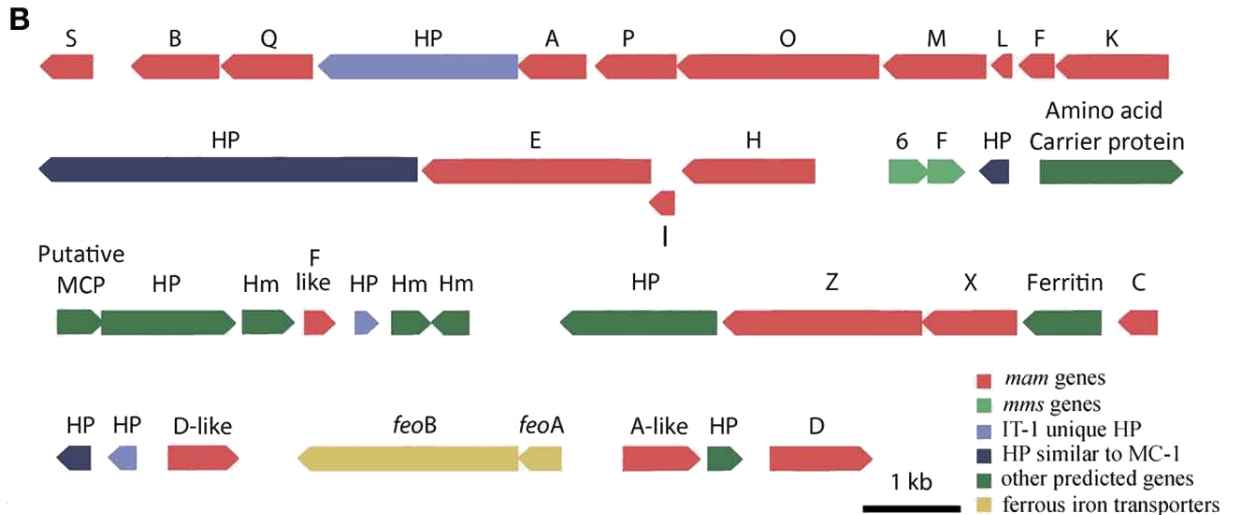


Figura 27. Organização dos genes de biomineralização em *Mf. australis* cepa IT-1. Os iniciadores foram desenhados para os genes *mamB*, *mamC*, *mamD*, *mamH*, *mamK*, *mamS* e *mms6*. Estes genes encontram-se em operons distintos e coficiam funções de invaginação da membrana do magnetossomo, transporte de ferro, controle do tamanho e morfologia do cristal e alinhamento da cadeia. Figura retirada de Morillo *et al.*, (2014).

Portanto, podemos observar que a partir de diferentes técnicas é possível confirmar que as sequências de profagos preditas em *Mf. australis* cepa IT-1 de fato correspondem a produção de uma ou mais partículas virais produzidas pelo coco magnetotático isolado da lagoa de Itaipu, a *Mf. australis* cepa IT-1 (Figuras 19, 20 e 21). É possível, então, notar que alguns genes de biomineralização são, em um primeiro momento, empacotados pelo(s) fago(s). A partir do sequenciamento destes fagos será possível determinar de fato quais genes são empacotados pela partícula viral dentre outras análises. Também pretendemos utilizar a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR do inglês *quantitative polymerase chain reaction*) como ferramenta de quantificação para comparar com a quantificação de partículas virais feita por citometria de fluxo (Figura 19). Neste ensaio, serão futuramente desenhados iniciadores para genes (i) do bacteriófago e (ii) de biomineralização a partir do genoma sequenciado destas partículas virais. Embora inicial, este estudo pode ajudar na compreensão de fagos como ferramentas para a evolução do comportamento magnetotático dentro domínio Bacteria.

Ainda sobre a evolução da magnetotaxia, sabe-se que esse comportamento está amplamente disseminado em microrganismos pertencentes ao domínio Bacteria. Já foram descritos representantes magnetotáticos nos filos Proteobacteria, Nitrospirae e Omnitrophica. Estes representantes apresentam diversidade quanto a morfologia da célula, do magnetossomo e a composição química do cristal. Dessa forma, estudos genômicos sobre BMs têm se intensificado nos últimos anos e tais estudos são responsáveis por fornecerem informações que permitam um melhor entendimento sobre a evolução da magnetotaxia e da biomineralização em

microrganismos procariotos. Estes microrganismos estão envolvidos na ciclagem de diferentes elementos químicos no meio ambiente como carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e ferro (Bazylinski e Frankel, 2004). O Ferro é o elemento químico que mais tem sido estudado ultimamente pelos grupos que pesquisam BMs e este é componente imprescindível para a formação do nanocristal ferromagnético.

Estima-se que o comportamento magnetotático entre microrganismos possa ter sido selecionado a partir de pressões evolutivas como grandes concentrações de Ferro (II) nos oceanos e baixas pressões de Oxigênio na atmosfera (Lin *et al.*, 2017). Essas condições, durante o éon Arqueano, transformavam os oceanos em uma atmosfera redutora que também possuía nutrientes como CO_2 , H_2 , SO_2 , H_2S , NO , NO_3^- , NO_2^- e NH_4^+ , para sustentar um metabolismo anaeróbico ou microaerófilo entre os microrganismos antes da Grande Oxigenação (Canfield, Rosing e Bjerrum, 2006). Baseado nestas observações, supõe-se que o comportamento magnetotático tenha sido selecionado positivamente visto que: (i) todas as BMs descritas até o momento são microaerófilas ou anaeróbias (Bazylinski e Frankel, 2004); (ii) muitas BMs quimiolitotróficas e são capazes de fixar CO_2 através do ciclo reverso dos ácidos tricarboxílicos (Williams *et al.*, 2006); (iii) todas as BMs são capazes de reduzir NO_3^- , NO_2^- , e NO por desnitrificação e capazes de oxidar H_2S pela via da oxidação de enxofre; e (iv) a temperatura dos oceanos era parecida com as atuais temperaturas dos oceanos tropicais, variando de 26 a 35°C (Blake, Chang e Leplan, 2010) e de 55 a 85°C (Knauth, 2005).

Lin *et al.* (2018) propôs dois modelos sobre a evolução do comportamento magnetotático entre bactérias (Figura 28). Ambos os modelos consideram um LUCA magnetotático (LUCA do inglês *last universal common ancestor*) e propõe eventos de THG para explicar a transferência dos genes de biomineralização entre bactérias de filos distantes filogeneticamente como é o caso dos filos Proteobacteria e Nitrospirae. Também propõe neste trabalho que os genes que codificam a síntese dos magnetossomos de greigita (Fe_3S_4) podem ter origem a partir de um evento de duplicação e divergência dos genes que codificam a síntese dos magnetossomos de magnetita (Fe_3O_4).

No primeiro modelo proposto (Lin *et al.*, 2018), o LUCA magnetotático seria uma bactéria produtora de magnetossomos de magnetita e seria ancestral de bactérias dos filos Proteobacteria, Omnitrophica e Nitrospirae (Figura 28A). Múltiplos eventos independentes de perda de MGCs podem ter acontecido em cada filo ou classe de BM. O MGC de magnetita sofreu uma duplicação, em algum momento, e estes genes divergiram ou mutaram passando a ser um

MGC de greigita em Deltaproteobacteria. Suspeita-se que o MGC de greigita pode ter sido transferido para os filos Planctomycetes e Latescibacteria. Esses eventos podem caracterizar uma THG antiga visto a grande distância filogenética entre eles (Figura 28; seta azul claro tracejada). Além disso, eventos recentes de THG (Figura 28; seta azul escuro) podem ser responsáveis pela transferência e troca de alguns genes de biomineralização entre os filos Proteobacteria, Nitrospirae e Omnitrophica.

No segundo modelo proposto (Lin *et al.*, 2018), um MGC desconhecido estaria presente no LUCA magnetotático e este ancestral seria comum aos representantes magnetotáticos dos filos Proteobacteria, Nitrospirae, Omnitrophica e das sequências de metagenoma recuperadas dos filos Planctomycetes e Latescibacteria (Figura 28B). Este MGC desconhecido teria sido duplicado, em algum momento, e divergido em MGCs de greigita e magnetita. Estes MGCs podem ter sido perdidos ao longo do tempo e algumas bactérias ficaram com os dois MGCs – de magnetita e greigita – enquanto algumas perderam os dois e outras perderam apenas um dos MGCs, conservando o outro. Eventos de THG recentes (seta azul) podem ter ocorrido entre bactérias dos filos Proteobacteria, Nitrospirae e Omnitrophica sendo responsável pela transferência de alguns genes de biomineralização. Em ambas os dois modelos propostos, o que se têm como evidenciado é que a herança vertical junto com eventos independentes de THG e perdas de MGCs são os fatores que tem determinado a evolução da magnetotaxia. Embora os eventos de THG de genes de biomineralização são considerados uma das forças da evolução de BMs, nenhum estudo propôs o mecanismo pelo qual estes genes foram adquiridos.

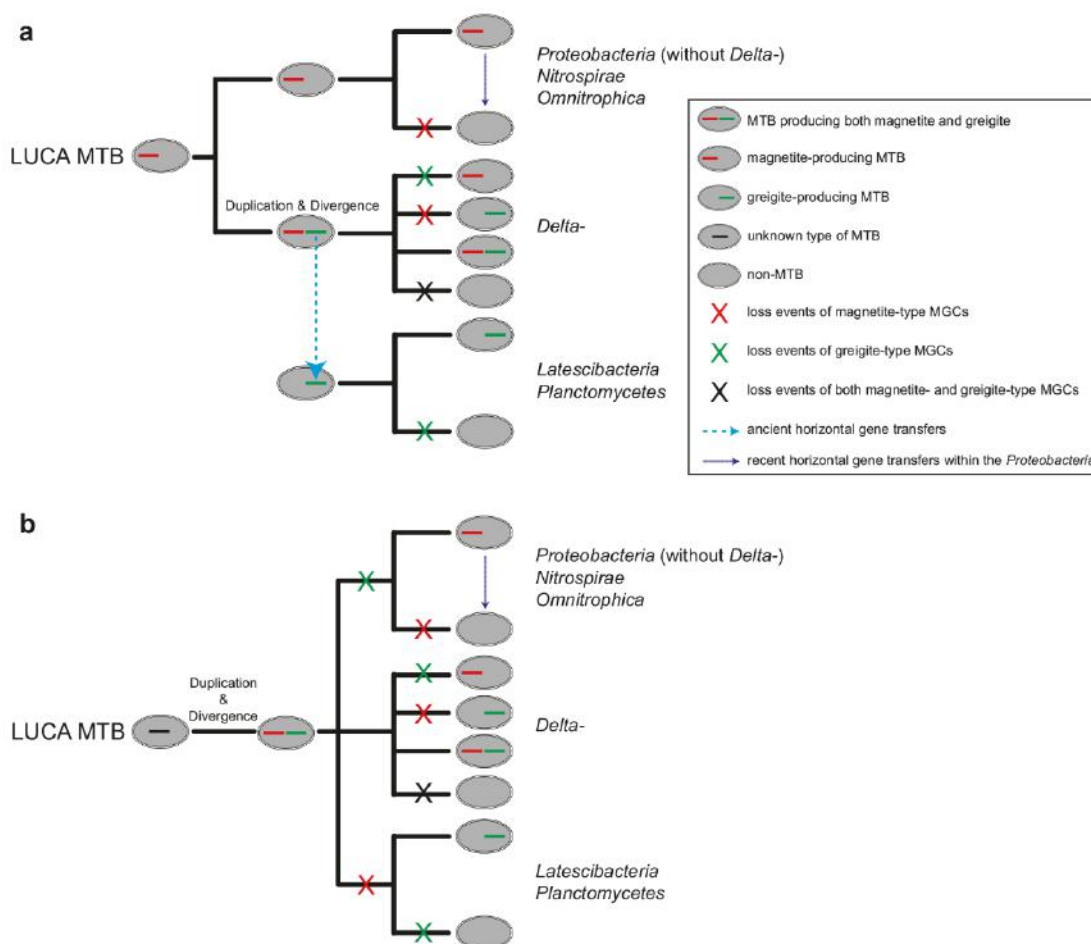


Figura 28. Modelos possíveis sobre a evolução da magnetotaxia no domínio Bacteria. **A.** Modelo considerando eventos de THG antigos e recentes. **B.** Modelo considerando apenas eventos de THG recentes. Ambos modelos propõem a existência de um LUCA magnetotático. Divergência e duplicação de MGCs e eventos de THG seriam necessários para explicar o espalhamento dos genes de biomineralização. Figura retirada de Lin *et al.* (2018).

Desse modo, a predição, isolamento e caracterização de bacteriófagos na BM *Mf. australis* cepa IT-1 pode ajudar na compreensão da disseminação do comportamento magnetotático no domínio Bacteria. Sabe-se, por fim, que bacteriófagos são produzidos pela *Mf. australis* cepa IT-1 e que estes podem carrear genes de biomineralização. Estudos futuros se tornam necessários para determinar o papel destes fagos na transferência horizontal de genes de biomineralização.

Um estudo recente demonstrou a presença de íons de ferro no domínio *needle* da cauda do fago T4, mais especificamente na proteína gp37 (Bartual *et al.*, 2010) (Figura 29). Sabe-se que o ferro é um elemento limitante nos oceanos (Gordon, Martin e Knauer, 1982) e que BMs possuem um alto aporte de Ferro (Bazylinski e Frankel, 2004). Em sistemas não-marinhos já é bem estabelecido que fagos competem pelos receptores de sideróforos da bactéria, utilizando como uma estratégia de infecção (Neilands *et al.*, 1979). Nesse contexto, Bonnain, Breitbart e

Buck (2016) propuseram, então, a “hipótese do cavalo de Tróia de Ferro” (do inglês *Ferrojan Horse Hypothesis*). Os autores propõem que no ambiente marinho a competição de fagos pelo receptor de sideróforos em bactérias pode acontecer e talvez essa possa ser considerada uma estratégia de infecção destes vírus (Figura 30). Portanto, durante o momento da adsorção do fago na superfície celular, o fago seria favorecido pela interação entre os íons de ferro presente em sua cauda e o receptor bacteriano para sideróforos.

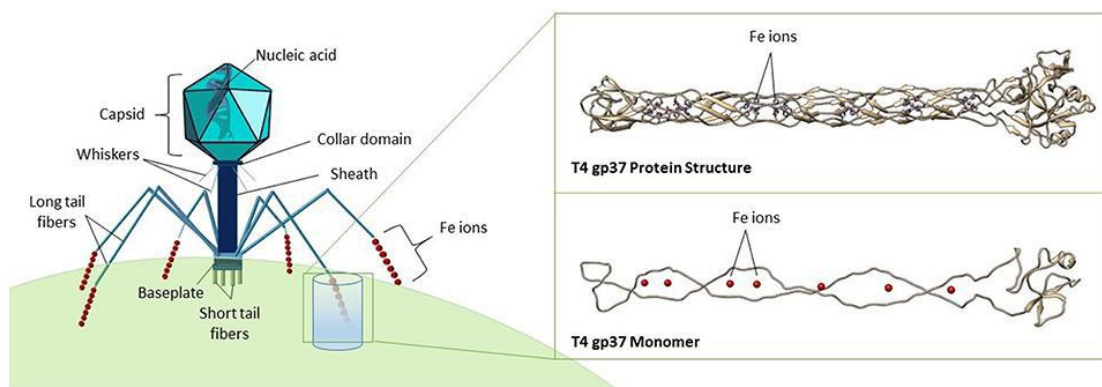


Figura 29. Presença de íons de ferro na cauda do fago T4. Os íons de ferro (esferas vermelhas) se localizam no domínio *needle* da cauda de forma octaédrica na proteína gp37 e interagindo diretamente com domínios de histidina. Figura retirada de Bonnain, Breitbart e Buck (2016).

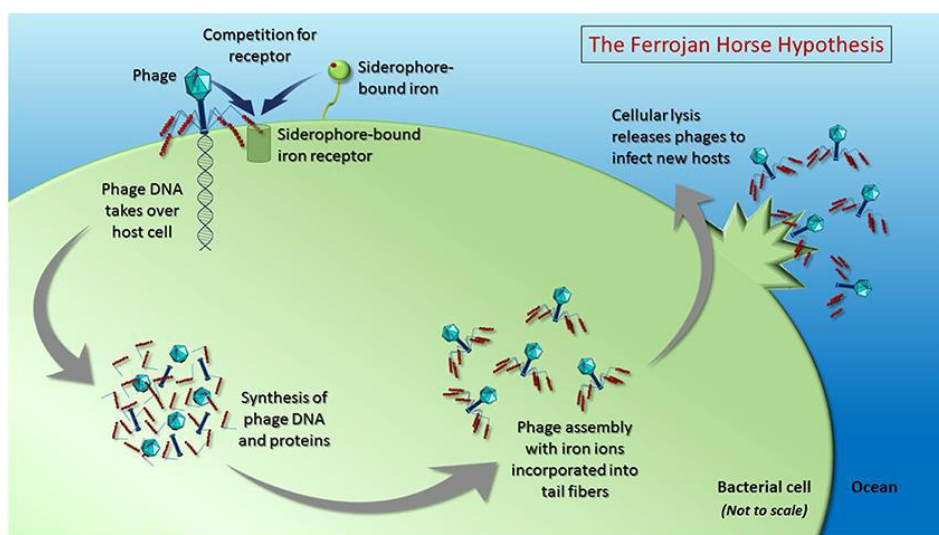


Figura 30. “Ferrojan Horse Hypothesis” proposto por Bonnain, Breitbart e Buck (2016). Tal modelo expõe que fagos talvez possam se beneficiar, em ambientes marinhos, da interação de íons de Ferro presente em sua cauda e o receptor do hospedeiro para sideróforos. Íons de Ferro estão demarcados como esferas vermelhas. Figura retirada de Bonnain, Breitbart e Buck (2016).

Dentro do contexto de BMs essa hipótese se tornaria mais viável ainda visto que essas bactérias necessitam quantidades de ferro maior do que outras bactérias não magnetotáticas (Bazylinski e Frankel, 2004). Inclusive, algumas BMs já foram descritas possuindo sideróforos como os espirilos magnetotáticos *Ms. magneticum* cepa AMB-1 (Calugay *et al.*, 2003) e *Ms.*

magnetotacticum cepa MS-1 (Taoka, Umeyama e Fukumori, 2009). Portanto, em BMs a competição de fagos por receptores de sideróforos pode ajudar a entender melhor o contexto em que essas bactérias foram infectadas por esses fagos. Embora a hipótese pareça promissora, ela ainda carece de estudos que comprovem que fagos são capazes de infectar bactérias marinhas através da competição pelo receptor de sideróforos assim como já é descrito para sistemas não-marinhas.

7. Conclusão

- i. A predição de profagos utilizando os genomas disponíveis nos bancos de dados e a sua análise pela ferramenta PHASTER (Arndt *et al.*, 2017), indica que BMs possuem profagos classificados em 4 famílias: Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae e Inoviridae. Em número absoluto de sequências, profagos da família Siphoviridae foram os mais encontrados em BMs. Profagos da família Myoviridae estão presentes em todos os grupos taxonômicos de BMs descritas na literatura.
- ii. Profagos presentes na espécie *Mf. australis* cepa IT-1 agrupam-se em *cluster* distante dos fagos preditos na sua bactéria mais próxima filogeneticamente, *Mc. marinus* cepa MC-1.
- iii. Dentro do grupo de cocos magnetotáticos, os profagos de *Mf. australis* cepa IT-1 dividiram um ancestral comum com profagos de cocos magnetotáticos preditos de sequências de metagenoma de BMs.
- iv. Por citometria de fluxo é possível observar duas populações na cultura bacteriana: (i) a etaproteobactéria magnetotática *Mf. australis* cepa IT-1 e (ii) as partículas virais. Também é possível quantificar as populações observadas bem como estabelecer uma relação entre a quantidade de fagos produzidos por bactéria. Na análise do cultivo, obteve-se $22,82 \pm 3,86 \times 10^6$ fagos/mL e $5,54 \pm 1,48 \times 10^5$ bactérias/mL, sendo a razão de $46,9 \pm 17,5$ fagos por bactéria. Ao purificar os fagos, obteve-se $7,53 \pm 0,96 \times 10^6$ partículas virais/mL.
- v. O bacteriófago produzido na cultura de *Mf. australis* cepa IT-1 tem diâmetro médio de aproximadamente $101,9 \pm 10,3$ nm (n=20), que corresponde ao tamanho esperado de fagos envelopados descritos na literatura. A determinação da morfologia do capsídeo é dificultada por conta de um provável envelope viral que têm composição lipídica, o que dificulta a penetração do contrastante na amostra.
- vi. Os genes de biomineralização do magnetossomo *mamB*, *mamC*, *mamD*, *mamH* e *mamK* foram detectados usando como molde o genoma do bacteriófago produzido por *Mf. australis* cepa IT-1. Em contrapartida, os genes de biomineralização *mamS* e *mms6* não foram detectados no genoma do fago. Esses resultados sugerem a presença de genes de biomineralização no genoma fágico e que esse mesmo grupo de genes é empacotado no bacteriófago produzido por *Mf. australis* cepa IT-1.

8. Referências

- Abreu, F., Martins, J.L., Silveira, T.S., Keim, C.N., de Barros, H.G., Filho, F.J. e Lins, U. (2007). '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*', a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1318-1322.
- Abreu, F., Cantao, M. E., Nicolás, M. F., Barcellos, F. G., Morillo, V., Almeida, L. G., Nascimento, F., Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A., Vasconcelos, A.T.R. e Lins, U. (2011). Common ancestry of iron oxide-and iron-sulfide-based biomineralization in magnetotactic bacteria. *The ISME Journal* 5(10), 1634.
- Abreu, F., Silva, K.T., Leão, P., Guedes, I.A., Keim, C.N., Farina, M., e Lins, U. (2013). Cell adhesion, multicellular morphology, and magnetosome distribution in the multicellular magnetotactic prokaryote *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*. *Microscopy and Microanalysis* 19(3), 535-543.
- Abreu, F., Morillo, V., Nascimento, F. F., Werneck, C., Cantao, M. E., Ciapina, L. P., de Almeida, L.G., Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A., de Vasconcelos, A.T. e Lins, U. (2014). Deciphering unusual uncultured magnetotactic multicellular prokaryotes through genomics. *The ISME Journal* 8(5), 1055.
- Abreu, F., Leão, P., Vargas, G., Cypriano, J., Figueiredo, V., Enrich-Prast, A., Bazylinski, D.A. e Lins, U. (2018). Culture-independent characterization of a novel magnetotactic member affiliated to the Beta class of the Proteobacteria phylum from an acidic lagoon. *Environmental Microbiology* 20(7), 2615-2624.
- Araujo, A. C. V., Morillo, V., Cypriano, J., Teixeira, L. C. R. S., Leão, P., Lyra, S., Almeida, L.G., Bazylinski, D.A., Ribeiro de Vasconcelos, A.T., Abreu, F. e Lins, U. (2016). Combined genomic and structural analyses of a cultured magnetotactic bacterium reveals its niche adaptation to a dynamic environment. *BMC genomics*, 17(8), 726.
- Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y. e Wishart, D.S. (2017). PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Briefings in Bioinformatics*, bbx121.
- Baker, B. J., Lazar, C. S., Teske, A. P. e Dick, G. J. (2015). Genomic resolution of linkages in carbon, nitrogen, and sulfur cycling among widespread estuary sediment bacteria. *Microbiome* 3(1), 14.
- Balcazar, J.L. (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLOS Pathog.* 10(7), e1004219.
- Bartual, S. G., Otero, J. M., Garcia-Doval, C., Llamas-Saiz, A. L., Kahn, R., Fox, G. C. e van Raaij, M. J. (2010). Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107(47), 20287-20292.
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. e Jannasch, H.W. (1988). Anaerobic magnetite production by marine, magnetotactic bacterium. *Nature* 334, 518-519.
- Bazylinski, D. A., B. R. Heywood, S. Mann, And R. B. Frankel. (1993). Fe₃O₄ and Fe₃S₄ in a bacterium. *Nature* 366, 218.
- Bazylinski, D.A. e Frankel, R.B. (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Reviews Microbiology* 2, 217–230.
- Blake, R. E., Chang, S. J., e Lepland, A. (2010). Phosphate oxygen isotopic evidence for a temperate and biologically active Archean ocean. *Nature.* 464(7291), 1029.
- Blakemore, R.P., Maratea D. e Wolfe, R.S. (1979). Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 140(2),720-9.
- Bonnain, C., Breitbart, M. e Buck, K. N. (2016). The Ferrojan horse hypothesis: iron-virus interactions in the ocean. *Frontiers in Marine Science*, 3, 82.
- Bose, M. e Barber, R.D. (2006). Prophage Finder: a prophage loci prediction tool for prokaryotic genome sequences. *In Silico Biol.* 6, 223–227.

- Brenner, S. e Horne, R.W. (1959). A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta.* 34, 103-10.
- Brüssow, H. e Hendrix, R. W. (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108(1), 13-16.
- Brüssow, H., Canchaya, C. e Hardt, W.D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(3), 560-602.
- Cabral, A.S., Lessa, M.M., Junger, P.C., Thompson, F.L e Paranhos, R. (2017). Virioplankton dynamics are related to eutrophication levels in a tropical urbanized bay. *PLOS One.* 12(3), e0174653.
- Calugay, R. J., Miyashita, H., Okamura, Y. e Matsunaga, T. (2003). Siderophore production by the magnetic bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *FEMS Microbiology Letters.* 218(2), 371-375.
- Canfield, D. E., Rosing, M. T., e Bjerrum, C. (2006). Early anaerobic metabolisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 361(1474), 1819-1836.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N. e Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(1), 4516-22.
- Chen, Y. R., Zhang, W. Y., Zhou, K., Pan, H. M., Du, H. J., Xu, C., Pradel, N., Santini, C.L., Li, J.H., Huang, H., Pan, Y.X., Xiao, T. e Wu, L.F. (2016). Novel species and expanded distribution of ellipsoidal multicellular magnetotactic prokaryotes. *Environmental microbiology reports*, 8(2), 218-226.
- Clokic, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V. e Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage* 1(1), 31-45.
- DeLong, E.F., Frankel, R.B. e Bazylnski, D.A. (1993). Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria. *Science.* 259, 803.
- Descamps, E. C., Monteil, C. L., Menguy, N., Ginet, N., Pignol, D., Bazylnski, D. A. e Lefèvre, C. T. (2017). *Desulfamplus magnetovallimortis* gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium from a brackish desert spring able to biomineralize greigite and magnetite, that represents a novel lineage in the Desulfobacteraceae. *Systematic and Applied Microbiology.* 40, 280-289.
- Diziuba, M., Koziava, V., Grouzdev, D., Burganskaya, E., Baslerov, R., Kolganova, T., Chernyadyev, A., Osipov, G., Andrianova, E., Gorlenko, V. e Kuznetsov, B. (2016). *Magnetospirillum caucaseum* sp. nov., *Magnetospirillum marisnigri* sp. nov. and *Magnetospirillum moscoviense* sp. nov., freshwater magnetotactic bacteria isolated from three distinct geographical locations in European Russia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 2069-2077.
- Dong, Y., Li, J., Zhang, W., Zhang, W., Zhao, Y., Xiao, T., Wu, L.F. e Pan, H. (2016). The detection of magnetotactic bacteria in deep sea sediments from the east P acific M anganese N odule P rovince. *Environmental microbiology reports*, 8(2), 239-249.
- Drexler, H. (1970). Transduction by bacteriophage T1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 66(4), 1083-8.
- Du, H. J., Chen, Y. R., Zhang, R., Pan, H. M., Zhang, W. Y., Zhou, K., Wu, L.F. e Xiao, T. (2015). Temporal distributions and environmental adaptations of two types of multicellular magnetotactic prokaryote in the sediments of L ake Y uehu, C hina. *Environmental Microbiology Reports* 7(3), 538-546.
- Dunin-Borkowski, R. E., McCartney, M. R., Frankel, R. B., Bazylnski, D. A., Pósfai, M., e Buseck, P. R. (1998). Magnetic microstructure of magnetotactic bacteria by electron holography. *Science* 282(5395), 1868-1870.
- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., Amitai, G. e Sorek, R. (2017). Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature*, 541(7638), 488.

- Farina, M., Kachar, B., Lins, U., Broderick, R. e Lins De Barros, H. (1994). The observation of large magnetite (Fe_3O_4) crystals from magnetotactic bacteria by electron and atomic force microscopy. *Journal of Microscopy* 173, 1-8.
- Feiss, M., Adyha, S. e Court, D.L. (1972). Isolation of plaque-forming, galactose-transducing strains of phage λ . *Genetics*. 71(2), 189-206.
- Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., Johnson, M.S. e Taylor, B. (1997). Magneto-Aerotaxis in Marine Cocoid Bacteria. *Biophysical Journal*. 73, 994-1000.
- Frankel, R.B.; Williams, T. e Bazylinski, D.A. (2006). Magneto-Aerotaxis. In *Magnetoreception and Magnetosome in Bacteria*, 2-24. Editado por: Springer-Verlag D. Berlin Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag.
- Gogarten, J.P. e Townsend, J.P. (2005). Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(9):679-87.
- Gordon, R. M., Martin, J. H. e Knauer, G. A. (1982). Iron in north-east Pacific waters. *Nature*. 299(5884), 611.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *Epidemiology & Infection*, 27(2), 113-159.
- Grouzdev, D.S., Dziuba, M.V., Sukhacheva, M.S., Mardanov, A.V., Beletskiy, A.V., Kuznetsov, B.B. e Skryabin, K.G. (2014). Draft Genome Sequence of *Magnetospirillum* sp. Strain SO-1, a Freshwater Magnetotactic Bacterium Isolated from the Ol'khovka River, Russia. *Genome Announc.* 2(2), e00235-14.
- Gyles, C. e Boerlin, P. (2014). Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Veterinary Pathology* 51(2), 328–340.
- Higuera, G., Bastía, R., Tsertsvadze, G., Romero, J. e Espejo, R. (2013). Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 395, 128–133.
- Hobbs, Z. e Abedon, S. T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'. *FEMS Microbiology Letters*. 363(7).
- Hogness, D.S. (1966). The Structure and Function of the DNA from Bacteriophage Lambda. *J. Gen. Physiol.* 49(6), 29–57.
- Holloway, B.W. e Monk, M. (1959). Transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature* 184, 1426–1427.
- Husnik, F. e McCutcheon, J. P. (2018). Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology*. 16(2), 67.
- Ji, B., Zhang, S.D., Arnoux, P., Rouy, Z., Alberto, F., Philippe, N., Murat, D., Zhang, W.J., Rioux, J.B., Ginet, N., Sabaty, M., Mangenot, S., Pradel, N., Tian, J., Yang, J., Zhang, L., Zhang, W., Pan, H., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Li, Y., Xiao, T., Médigue, C., Barbe, V., Pignol, D., Talla, E. e Wu, L.F. (2014). Comparative genomic analysis provides insights into the evolution and niche adaptation of marine *Magnetospira* sp. QH-2 strain. *Environ. Microbiol.* 16, 525-44.
- Ji, B., Zhang, S. D., Zhang, W. J., Rouy, Z., Alberto, F., Santini, C. L., Mangenot, S., Gagnet, S., Philippe, N., Pradel, N., Zhang, L., Tempel, S., Li, Y., Médigue, C., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Barbe, V., Talla, E. e Zhang, L. (2017). The chimeric nature of the genomes of marine magnetotactic cocoid-ovoid bacteria defines a novel group of Proteobacteria. *Environmental Microbiology* 19(3), 1103-1119.
- Jogler, C., Kube, M., Schübbe, S., Ulrich, S., Telling, H., Bazylinski, D.A., Reinhardt, R. e Schüler, D. (2009). Comparative analysis of magnetosome gene clusters in magnetotactic bacteria provides further evidence for horizontal gene transfer. *Environmental Microbiology*. 11, 1267–1277.
- Jogler, C. e Schüler, D. (2009). Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 63: 501-521.

- Jogler, C., Niebler, M., Lin, W., Kube, M., Wanner, G., Kolinko, S., Stief, P., Beck, A.J., De Beer, D., Petersen, N., Pan, Y., Amann, R., Reinhardt, R. e Schüler, D. (2010). Cultivation-independent characterization of ‘*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*’ via ultrastructural, geochemical, ecological and metagenomic methods. *Environmental Microbiology* 12, 2466-2478.
- Junger, P. C., Amado, A. M., Paranhos, R., Cabral, A. S., Jacques, S. M. e Farjalla, V. F. (2018). Salinity drives the virioplankton abundance but not production in tropical coastal lagoons. *Microbial Ecology* 75(1), 52-63.
- Keeling, P.J. e Palmer, J.D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Genet.* 9(8), 605-18.
- Knauth, L. P. (2005). Temperature and salinity history of the Precambrian ocean: implications for the course of microbial evolution. In *Geobiology: Objectives, Concepts, Perspectives* (pp. 53-69). Elsevier.
- Kolinko, S., Jogler, C., Katzmann, E., Wanner, G., Peplies, J. e Schüler, D. (2012). Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3. *Environmental Microbiology* 14, 1709–1721.
- Kolinko, S., Richter, M., Glöckner, F. O., Brachmann, A. e Schüler, D. (2014). Single-cell genomics reveals potential for magnetite and greigite biomineralization in an uncultivated multicellular magnetotactic prokaryote. *Environmental Microbiology Reports* 6(5), 524-531.
- Kolinko, S., Richter, M., Glöckner, F. O., Brachmann, A., e Schüler, D. (2016). Single-cell genomics of uncultivated deep-branching magnetotactic bacteria reveals a conserved set of magnetosome genes. *Environmental Microbiology* 18(1), 21-37.
- Kovaliova, A., Kadnikov, V.V., Antsiferov, D.V., Beletsky, A.V., Danilova, E.V., Avakyan, M.R., Mardanov, A.V. e Karnachuk, O.V. (2017). Genome sequence of the acid-tolerant *Desulfovibrio* sp. DV isolated from the sediments of a Pb-Zn mine tailings dam in the Chita region, Russia. *Genom Data.* 11:125-127.
- Krüger, A. e Lucchesi, P.M. (2015). Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology.* 161(3), 451-62.
- Krupovic, M. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Plasmaviridae. *Journal of General Virology.* 99(5), 617-618.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing, p 115–175. In Stackebrandt E, Goodfellow M(ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* Wiley& Sons, Chichester, United Kingdom.
- Lefèvre, C.T., Abreu, F., Schmidt, M.L., Lins, U., Frankel, R.B., Hedlund, B.P., e Bazylinski, D.A. (2010). Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3740-3743.
- Lefèvre, C.T., Frankel, R.B., Pósfai, M., Prozorov, T., e Bazylinski, D.A. (2011a). Isolation of obligately alkaliphilic magnetotactic bacteria from extremely alkaline environments. *Environmental Microbiology* 13, 2342-2350.
- Lefèvre, C.T., Frankel, R.B., Abreu, F., Lins, U. e Bazylinski, D.A. (2011b). Culture-independent characterization of a novel, uncultivated magnetotactic member of the *Nitrospirae* phylum. *Environmental Microbiology* 13(2), 538–549.
- Lefèvre, C. T., Menguy, N., Abreu, F., Lins, U., Pósfai, M., Prozorov, T., Pignol, D., Frankel, R.B. e Bazylinski, D.A. (2011c). A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria. *Science* 334, 1720-1723.
- Lefèvre, C.T., Pósfai, M., Abreu, F., Lins, U., Frankel, R.B., e Bazylinski, D.A. (2011d). Morphological features of elongated-anisotropic magnetosome crystals in magnetotactic bacteria of the *Nitrospirae* phylum and the *Deltaproteobacteria* class. *Earth and Planetary Science Letters* 312, 194-200.
- Lefevre, C. T., Vilorio, N., Schmidt, M. L., Posfai, M., Frankel, R. B., e Bazylinski, D. A. (2012). Novel magnetite-producing magnetotactic bacteria belonging to the Gammaproteobacteria. *The ISME Journal* 6(2), 440.

- Lefèvre, C.T., e Bazylinski, D.A. (2013). Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 77, 497-526.
- Lefèvre, C.T., Trubitsyn, D., Abreu, F., Kolinko, S., Jogler, C., Almeida, L.G.P., de Vasconcelos, A.T., Kube, M., Reinhardt, R., Lins, U., Pignol, D., Schüler, D., Bazylinski, D.A. e Ginet, N. (2013a). Comparative genomic analysis of magnetotactic bacteria from the *Deltaproteobacteria* provides new insights into magnetite and greigite magnetosome genes required for magnetotaxis. *Environmental Microbiology* 15, 2712-2735.
- Lefèvre, C.T., Trubitsyn, D., Abreu, F., Kolinko, S., Almeida, L.G.P., Vasconcelos, A.T.R., Lins, U., Schüler, D., Ginet, N., Pignol, D. e Bazylinski, D.A. (2013b). Monophyletic origin of magnetotaxis and the first magnetosomes. *Environmental Microbiology* 15, 2267-2274.
- Lefèvre, C.T. e Wu, L.F. (2013). Evolution of the bacterial organelle responsible for magnetotaxis. *Trends in Microbiology* 21, 534-43.
- Lennox, E.S. (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*. 1(2), 190-206.
- Lin, W., Wang, Y., Li, B. e Pan, Y. (2012). A biogeographic distribution of magnetotactic bacteria influenced by salinity. *ISME Journal* 6, 475–479.
- Lin, W., Bazylinski, D.A., Xiao, T., Wu, L.F., e Pan, Y. (2014a). Life with compass: diversity and biogeography of magnetotactic bacteria. *Environmental Microbiology* 16, 2646-2658.
- Lin, W., Deng, A., Wang, Z., Li, Y., Wen, T., Wu, L. F., Wu, M. e Pan, Y. (2014b). Genomic insights into the uncultured genus ‘*Candidatus Magnetobacterium*’ in the phylum *Nitrospirae*. *The ISME Journal* 8, 2463-2477.
- Lin, W. e Pan, Y. (2015). A putative greigitetype magnetosome gene cluster from the candidate phylum Latescibacteria. *Environmental Microbiology Reports* 7, 237-242.
- Lin, W., Pan, Y. e Bazylinski, D.A. (2017) Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria. *Environ. Microbiol. Rep.* 9(4), 345-356.
- Lin, W., Paterson, G.A., Zhu, Q., Wang, Y., Kopylova, E., Li, Y., Knight, R., Bazylinski, D.A., Zhu, R., Kirschvink, J.L. e Pan, Y. (2017). Origin of microbial biomineralization and magnetotaxis during the Archean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 2171-2176.
- Lin, W., Zhang, W., Zhao, X., Roberts, A.P., Paterson, G.A., Bazylinski, D.A. e Pan, Y. (2018). Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. *The ISME Journal* 12(6), 1508.
- Lins, U., Keim, C.N., Evans, F.F., Farina, M. e Buseck, P.R. (2007). Magnetite (Fe₃O₄) and Greigite (Fe₃S₄) crystals in multicellular magnetotactic prokaryotes. *Geomicrobiol. J.* 24, 43–50.
- Lohße, A., Ullrich, S., Katzmann, E., Borg, S., Wanner, G., Richter, M., Voigt, B., Schweder, T. e Schüler, D. (2011). Functional analysis of the magnetosome island in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: the mamAB operon is sufficient for magnetite biomineralization. *PLoS ONE* 6, e25561.
- Mariano, R., Wuchty, S., Vizoso-Pinto, M.G., Häuser, R. e Uetz, P. (2016). The interactome of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages show highly specific patterns of interactions among bacteria and their phages. *Scientific Reports* 6(24597).
- Marvin, D. A., Symmons, M. F., & Straus, S. K. (2014). Structure and assembly of filamentous bacteriophages. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 114(2), 80-122.
- Matsunaga, T., Sakaguchi, T. e Todokoro, F. (1991). Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 651-655.

- Matsunaga, T., Okamura, Y., Fukuda, Y., Wahyudi, A.T., Murase, Y. e Takeyama, H. (2005). Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *DNA Res.* 12(3),157-66.
- Mavrigh, T. N. e Hatfull, G. F. (2017). Bacteriophage evolution differs by host, lifestyle and genome. *Nature Microbiology.* 2(9), 17112.
- Meier-Kolthoff, J. P. e Göker, M. (2017). VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics.* 33(21), 3396-3404.
- Meldrum, F.C., Mann, S., Heywood, B.R., Frankel, R.B. e Bazylinski, R.B. (1993a). Electron microscopy study of magnetosomes in two cultured vibrioid magnetotactic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B.* 251, 237– 242.
- Meldrum, F.C., Mann, S., Heywood, B.R., Frankel, R.B. e Bazylinski, D.A. (1993b). Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured Coccoid magnetotactic bacterium. *Proceedings of the Royal Society B.* 251, 231– 236.
- Molineux, I. J. e Panja, D. (2013). Popping the cork: mechanisms of phage genome ejection. *Nature Reviews Microbiology.* 11(3), 194.
- Monteil, C. L., Perrière, G., Menguy, N., Ginet, N., Alonso, B., Waisbord, N., Cruveiller, S., Pignol, D. e Lefèvre, C. T. (2018). Genomic study of a novel magnetotactic Alphaproteobacteria uncovers the multiple ancestry of magnetotaxis. *Environmental Microbiology* 20(12),4415-4430.
- Morillo, V., Abreu, F., Araujo, A. C., Almeida, L. G. P. D., Prast, A. E., Farina, M., A.T.R., de Vasconcelos, D.A. Bazylinski e Lins, U. (2014). Isolation, cultivation and genomic analysis of magnetosome biomineralization genes of a new genus of South-seeking magnetotactic cocci within the Alphaproteobacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 72.
- Murat, D., Quinlan, A., Vali, H., e Komeili, A. (2010). Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(12), 5593-5598.
- Nakazawa, H., Arakaki, A., Narita-Yamada, S., Yashiro, I., Jinno, K., Aoki, N., Tsuruyama, A., Okamura, Y., Tanikawa, S., Fujita, N., Takeyama, H. e Matsunaga, T. (2009). Whole genome sequence of *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 revealed common gene clusters in magnetotactic bacteria". *Genome Res.* 19(10):1801-8.
- Neilands, J. B. (1979). The ironic function of bacteriophage receptors. *Trends in Biochemical Sciences.* 4(5), 115-118.
- Ofir, G. e Sorek, R. (2018). Contemporary phage biology: From classic models to new insights. *Cell.* 172(6), 1260-1270.
- Oliveira, J., Mahony, J., Hanemaaijer, L., Kouwen, T. R., Neve, H., MacSharry, J. e van Sinderen, D. (2017). Detecting *Lactococcus lactis* Prophages by Mitomycin C-Mediated Induction Coupled to Flow Cytometry Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1343.
- Oksanen, H. M. e Consortium, I. R. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Corticoviridae. *The Journal of General Virology.* 98(5), 888.
- Petermann, H. e Bleil, U. (1993). Detection of live magnetotactic bacteria in South Atlantic deep-sea sediments. *Earth Planet. Sci. Lett.* 117, 223–228.
- Pósfai, M., Kasama, T. e Dunin-Borkowski, R.E. (2007). Characterization of bacterial magnetic nanostructures using high-resolution transmission electron microscopy and off-axis electron holography. In: *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, 197-225. Editado por: Springer-Verlag D. Berlin Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag.
- Pósfai, M., Lefèvre, C.T., Trubitsyn, D., Bazylinski, D.A., e Frankel, R.B. (2013). Phylogenetic significance of composition and crystal morphology of magnetosome minerals. *Frontiers in Microbiology* 4-344.

- Richter, M., Kube, M., Bazylinski, D., Lombardot, T., Glöckner, F.O., Teinhardt, R. e Schüler, D. (2007). Comparative Genome Analysis of Four Magnetotactic Bacteria Reveals a Complex set of Group-Specific Genes Implicated in Magnetosome Biomineralization and Function. *Journal of Bacteriology* 189, 4899.
- Rioux, J. B., Philippe, N., Pereira, S., Pignol, D., Wu, L. F., e Ginet, N. (2010). A second actin-like MamK protein in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 encoded outside the genomic magnetosome island. *PLoS One* 5, e9151.
- Sakaguchi, T., Arakaki, A. e Matsunaga, T. (2002). *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 215-221.
- Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M. e Oguma, K. (2006). The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102(48), 17472-7.
- San Martín, C., Huiskonen, J. T., Bamford, J. K., Butcher, S. J., Fuller, S. D., Bamford, D. H. e Burnett, R. M. (2002). Minor proteins, mobile arms and membrane-capsid interactions in the bacteriophage PRD1 capsid. *Nature Structural & Molecular Biology*. 9(10), 756.
- Sandy, M. e Butler, A. (2009). Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chemical Reviews*. 109(10), 4580-4595.
- Salmond, G. P. C e Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Genetics* 16, 472-482.
- Sato, K. e Campbell, A. (1970). Specialized transduction of galactose by lambda phage from a deletion lysogen. *Virology* 41(3), 474-87.
- Schübbe, S., Kube, M., Scheffel, A., Wawer, C., Heyen, U., Meyerdierks, A., Madkour, M.H., Mayer, F., Reinhardt, R. e Schüler, D. (2003). Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. *Journal of Bacteriology*. 185, 5779-5790.
- Schübbe, S., Williams, T.J., Xie, G., Kiss, H.E., Brettin, T.S., Martinez, D., Ross, C.A., Schüler, D., Cox, B.L., Neilson, K.H. e Bazylinski, D.A. (2009). Complete genome sequence of the chemolithoautotrophic marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 4835-4852.
- Schüler, D. (2008). Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(4), 654-72.
- Smalley, M.D., Marinov, G.K., Bertani, L.E. e DeSalvo, G. (2015). Genome Sequence of *Magnetospirillum magnetotacticum* Strain MS-1. *Genome Announc.*3(2), e00233-15.
- Soucy, S. M. Huang, J. e Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics* 16, 472-482.
- Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Van Gernerden, H. e Petersen, N. (1993). Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment". *Applied and Environmental Microbiology* 59(8), 2397-403.
- Spring, S., Lins, U., Amann, R., Schleifer, K.H., Ferreira, L.C., Esquivel, D.M. e Farina, M. (1998). Phylogenetic affiliation and ultrastructure of uncultured magnetic bacteria with unusually large magnetosomes. *Arch. Microbiol.* 169, 136-147.
- Stolz, J., Chang, S.B.R. e Kirschvink, J.L. (1986). Magnetotactic bacteria and single-domain magnetite in hemipelagic sediments. *Nature* 321,849-851.
- Susskind, M.M. e Botstein, D. (1978). Molecular genetics of bacteriophage P22. *Microbiol Rev.* 42(2), 385-413.
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5(10), 801.

- Takeda, Y., Morishita, T. e Yura, T. (1970). Specialized transduction of the galactose genes of *Escherichia coli* by phage ϕ 81. 41(2), 348-55.
- Taoka, A., Umeyama, C. e Fukumori, Y. (2009). Identification of iron transporters expressed in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*. *Current Microbiology*. 58(2), 177-181.
- Taoka, A., Kiyokawa, A., Uesugi, C., Kikuchi, Y., Oestreicher, Z., Morii, K., Eguchi, Y. e Fukumori, Y. (2017). Tethered Magnets Are the Key to Magnetotaxis: Direct Observations of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 Show that MamK Distributes Magnetosome Organelles Equally to Daughter Cells. *MBio* 8(4), e00679-17.
- Tarduno, J. A., Cottrell, R. D., Davis, W. J., Nimmo, F. e Bono, R. K. (2015). A Hadean to Paleoproterozoic geodynamo recorded by single zircon crystals. *Science* 349, 521-524.
- Toledo, L. (2016). Profagos na bactéria magnetotática *Magnetofaba australis* cepa IT-1. Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro.
- Trubitsyn, D., Abreu, F., Ward, F. B., Taylor, T., Hattori, M., Kondo, S., Trivedi, U., Staniland, S., Lins, U. e Bazylinski, D. A. (2016). Draft genome sequence of *Magnetovibrio blakemorei* strain MV-1, a marine vibrioid magnetotactic bacterium. *Genome announcements*, 4(6), e01330-16.
- Uebe, R., e Schüler, D. (2016). Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 14, 621-637.
- Walter, L. (1968). Nomarski differential interference-contrast microscopy. *ZEISS Information* 70, 114-120.
- Wang, Y., Lin, W., Li, J., Zhang, T., Li, Y., Tian, J., Gu, L., Heyden, Y.V. e Pan, Y. (2015). Characterizing and optimizing magnetosome production of *Magnetospirillum* sp. XM-1 isolated from Xi'an City Moat, China. *FEMS Microbiol Lett.* 362(21), fmv167.
- Welkos, S.L. e Holmes, R.K. (1981). Regulation of toxinogenesis in *Corynebacterium diphtheriae*. I. Mutations in bacteriophage beta that alter the effects of iron on toxin production. *J. Virol.* 37(3), 936-945.
- Wenter, R., Wanner, G., Schüler, D. e Overmann, J. (2009). Ultrastructure, tactic behaviour and potential for sulfate reduction of a novel multicellular magnetotactic prokaryote from North Sea sediments. *Environmental Microbiology* 11, 1493-1505.
- Werckmann, J., Cypriano, J., Lefèvre, C. T., Dembelé, K., Ersen, O., Bazylinski, D. A., Lins, U. e Farina, M. (2017). Localized iron accumulation precedes nucleation and growth of magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Scientific Reports* 7(1), 8291.
- Williams, T. J., Zhang, C. L., Scott, J. H., e Bazylinski, D. A. (2006). Evidence for autotrophy via the reverse tricarboxylic acid cycle in the marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(2), 1322-1329.
- Williams, T. J., Lefèvre, C. T., Zhao, W., Beveridge, T. J. e Bazylinski, D. A. (2012). *Magnetospira thiophila* gen. nov., sp. nov., a marine magnetotactic bacterium that represents a novel lineage within the *Rhodospirillaceae* (*Alphaproteobacteria*). *International Journal of Systematic and Environmental Microbiology* 62, 2443-2450.
- Wilson, G.G., Young, K.Y. Edlin, G.J. e Konigsberg, W. (1979). High-frequency generalised transduction by bacteriophage T4. *Nature* 280(5717), 80-2.
- Zeng, L., Skinner, S. O., Zong, C., Sippy, J., Feiss, M. e Golding, I. (2010). Decision making at a subcellular level determines the outcome of bacteriophage infection. *Cell*, 141(4), 682-691.
- Zhang, W.Y., Zhou, K., Pan, H.M., Yue, H.D., Jiang, M., Xiao, T. e Wu, L.F. (2012). Two genera of magnetococci with Bean-like Morphology from intertidal sediments of the Yellow Sea, China. *Applied Environmental Microbiology* 78, 5606-5611.
- Zhang, R., Chen, Y. R., Du, H. J., Zhang, W. Y., Pan, H. M., Xiao, T., e Wu, L. F. (2014). Characterization and phylogenetic identification of a species of spherical multicellular magnetotactic prokaryotes that produces both magnetite and greigite crystals. *Research in Microbiology* 165(7), 481-489.
- Zhou, K., Zhang, W., Zhang, K.Y., Pan, H., Zhang, S., Zhang, W., Yue, H., Li, Y., Xiao, T. e Wu, L.F. (2012). A novel genus of multicellular magnetotactic prokaryotes from the Yellow Sea. *Environmental Microbiology* 14, 405-413.

Zhu, K., Pan, H., Li, J., Yu-Zhang, K., Zhang, S.D., Zhang, W.Y., Zhou, K., Yue, H., Pan, Y., Xiao, T. e Wu, L.F. (2010). Isolation and characterization of a marine magnetotactic spirillum axenic culture QH-2 from na intertidal zone of the China Sea. *Research in Microbiolog.* 161, 276–283.

Zhulin, I.B., Bepalov, V.A., Johnson, M.S. e Taylor, B.L. (1996). Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 178, 5199-5204.

Zinder, N.D. e Lederberg, J. (1952). Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 64(5), 679-99.