

ENRIQUECIMIENTO DE MUESTRAS CON BACTERIAS MAGNETOTÁCTICAS PARA LA SÍNTESIS DE NANOMAGNETITA BIOGÉNICA

Magnetotactic Bacteria Samples Enrichment For Synthesis Of Biogenic Nanomagnetite

RESUMEN

Se evaluaron metodologías para la obtención de altas concentraciones de bacterias magnetotácticas (MTBs), ensayando medios de cultivo sintético (líquido, sólido y semisólido) y natural (sedimento estéril enriquecido). Se realizó enriquecimiento de muestras obtenidas en las represas de La Fe y de El Peñol, Antioquia - Colombia, adicionando soluciones de vitaminas, minerales y $FeCl_3$. Los resultados obtenidos mostraron que la adición de nutrientes a las muestras incrementa la concentración de MTBs después de 4 semanas de incubación. Considerando la dificultad para el cultivo de estos microorganismos, los resultados de este estudio constituyen un avance que perfeccionado permitirá la síntesis biogénica a gran escala de nanocristales magnéticos con uso potencial en nanotecnología y biomédicina.

PALABRAS CLAVES: Bacterias magnetotácticas, biomédica, magnetita, nanotecnología.

ABSTRACT

Different methodologies were used to obtain large MTB concentrations. Laboratory culture media, liquid, solid and semisolid were assessed; also, a natural culture medium was used. The enriched samples were obtained from samples taken at La Fe and El Peñol dams, Antioquia, Colombia, by adding vitamins, minerals, and $FeCl_3$. The enrichment was obtained after a period of four weeks. Based on the reported difficulties to cultivate these microorganisms, the present study constitutes a forward step to reach a large scale synthesis of biogenic magnetite with potential uses in nanotechnology and biomedicine.

KEYWORDS: Magnetotactic bacteria, Biomedicine, magnetite, nanotechnology.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos materiales y su aplicación a tecnologías modernas es un dinamismo que mueve a la sociedad post – industrial, la cual posee un acervo de conocimientos para avanzar en este campo. Sin embargo, para los países en vía de desarrollo, el desafío consiste en utilizar de forma óptima los recursos con los que cuentan, para no quedarse a la zaga de los avances científicos y tecnológicos.

Las bacterias magnetotácticas (MTBs) son organismos Gram-negativos que sintetizan cristales intracelulares nanométricos de óxidos de hierro como la magnetita (Fe_3O_4) o sulfuros de hierro como la greigita (Fe_3S_4). Se presentan en sedimentos de aguas dulces o marinas y en columnas de agua estratificadas de ríos, lagos, estuarios y mares [1,2,3] predominando en la zona de transición óxido – anóxica (ZTOA) [3].

Los cristales magnéticos sintetizados por las MTBs, presentan propiedades muy particulares y deseadas en los campos científico e industrial, como tamaño nanométrico, estructura cristalina organizada y pureza [4,5]. Los cristales intracelulares que han sido reportados hasta el momento, tienen como característica la presencia de una biocapa, compuesta por lípidos y polisacáridos [6], que los recubre y ordena en cadenas lineales en la bacteria, permitiéndole a ésta orientarse en el campo geomagnético. Es la biocapa la que permite que estas partículas sean compatibles con los seres vivos, lo que representa una propiedad muy útil en la medicina [4,5,6,7,8,9].

Las aplicaciones de minerales con magnetismo, brindan un aporte significativo para la ciencia y la tecnología como medio ideal de almacenamiento de datos en cintas, discos y burbujas magnéticas; han incursionado en la medicina para la inmovilización de sustancias bioactivas,

VIVIANA MORILLO L.

Bacterióloga, Candidata M. Sc. Biotecnología.
Universidad Nacional de Colombia
Sede Medellín.
vkmorill@unalmed.edu.co

ALEJANDRO SALAZAR V.

Estudiante Ingeniería Biológica
Universidad Nacional de Colombia
Sede Medellín.
asalaza@unal.edu.co

MARCO A. MARQUEZ.

Ingeniero Geologo. Ph. D.
Docente vinculado.
Universidad Nacional de Colombia
Sede Medellín.
mmarquezl@unalmed.edu.co

ALVARO MORALES A.

Físico. Ph. D.
Docente vinculado
Universidad De Antioquia
Amoral@fisica.udea.edu.co

elaboración de biosensores, transportadores de drogas antitumorales específicas, entre otros [10,11].

A pesar del enorme potencial que representa el estudio de las MTBs y de los cristales con propiedades magnéticas, producto de sus rutas metabólicas, la problemática que representa el encontrar medios de cultivo específicos para su crecimiento, impide el estudio de éstas y el aprovechamiento al máximo de sus propiedades y productos.

Por estas razones se vislumbra la pertinencia de esta investigación, cuyo objetivo central fue estudiar los requerimientos de las MTBs en cuanto a nutrición y condiciones de crecimiento y, eventualmente, encontrar un medio de cultivo adecuado para al menos una de las especies observadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Para el aislamiento de bacterias con propiedades magnéticas se seleccionaron dos represas de agua dulce, localizadas al nororiente del departamento de Antioquia, Colombia: La represa de La Fe, municipio del Retiro, localizada en la cordillera central (6° 6' 57" norte a 6° 6' 00" norte y 75° 30' 30" oeste a 75° 29' 36" oeste) con una altitud de 2156 m.s.n.m. y el embalse del Peñol del municipio de Guatapé, con coordenadas de 6° 13' 23" Norte y 75° 10' 28" oeste.

Toma de muestra

Las muestras fueron tomadas de la interfase agua-sedimento correspondiente a cada sitio de muestreo, a profundidades entre 160 – 310cm. Para ubicar la profundidad a la que se encontraba el *oxicline*, se utilizó un oxímetro marca HANNA. La toma de muestras se hizo en frascos de vidrio estériles de 600mL los cuales se llenaron con 2/3 de sedimento y 1/3 de agua.

Las muestras se transportaron al laboratorio, se almacenaron por 4 semanas a temperatura ambiente, tapa entreabierta y luz tenue, para suprimir organismos fotótrofos y permitir aireación y formación de una ZTOA en las muestras. Además, se les determinó parámetros físico – químicos de pH y Eh, empleando un pH-metro Handylab 1 y Eh-metro Hanna HI 3619, concentración de oxígeno disuelto (OD), con un oxímetro Hanna HI 9143; concentración de Fe total, Fe²⁺, Fe³⁺ (método 3500 Fe B. Colorimétrico – Fenantrolina) y sulfatos (método Normalizado 4500 SO₄²⁻ E. método turbidimétrico) según el Stándart Methods, 2002 para el análisis de aguas, utilizando un espectrofotómetro GENESYS™ 10 UV de barrido (tabla 1).

Profund. (cm)	Temp(° C)	pH (mV)	Eh (mV)	OD (ppm)	Fe total (ppm)	Fe ²⁺ (ppm)	Fe ³⁺ (ppm)	Sulfatos (ppm)
160 – 310	18	6.5	195-240	0.78 - 3.5	1.2-3.4	0.04 - 0.19	1.16 - 2.56	11.6 - 150

Tabla 1. Condiciones iniciales de las muestras. Los valores de temperatura (T) y pH son valores promedios; los valores de los otros parámetros muestran un rango de las muestras con MTBs.

Aislamiento y concentración de MTBs

Para aislar las MTBs se utilizó la técnica de separación descrita por Wajnberg *et al.* (1986) [12]; empleando un recipiente cilíndrico de vidrio con un capilar en un extremo (figura 1), al que se le adicionó una mezcla de suelo:agua. Éste se ubicó en el interior de un solenoide. Posteriormente se le aplicó un voltaje de 4.5 V de corriente directa, generando un campo magnético de aprox. 6 Gauss. Luego de 20 minutos, se extrajeron, aprox. cuatro gotas del líquido retenido en el capilar del recipiente y se almacenaron en un recipiente plástico hasta obtener un volumen concentrado de MTBs. Posteriormente, de cada aislamiento se verificó la presencia de MTBs con un microscopio óptico OLYMPUS CX31.

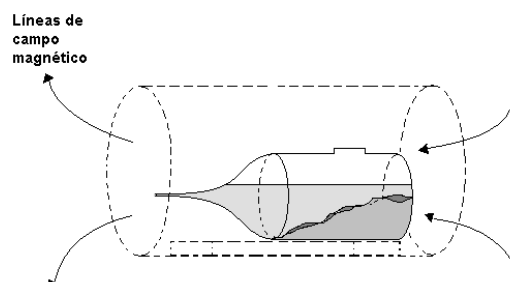


Figura 1. Dispositivo para en aislamiento de MTB.

Cultivo de bacterias magnetotácticas

Teniendo en cuenta las características metabólicas mixótrofas de las MTBs, se ensayaron diferentes metodologías para el crecimiento, enriquecimiento y mantenimiento de estos microorganismos: (i) un medio de cultivo químico definido (líquido, sólido y semisólido) modificado de Wolfe [4] utilizado para el crecimiento de *Aquaspirillum magnetotácticum*; (ii) un medio de cultivo natural en el que se empleó sedimento estéril y enriquecimiento de muestras con soluciones de vitamina, minerales y FeCl₃.

Cultivo químico definido: El medio de cultivo sintético contenía FeCl₃; ácido ascórbico, tartárico como fuente de carbono; extracto de levadura; una solución de minerales y una solución de vitaminas de uso farmacéutico, la cual posee vitaminas del complejo B, vitamina A, C, D, E y minerales traza como Fe, Zn, Co, Ni y otros

oligoelementos requeridos en los procesos metabólicos de las bacterias. Se prepararon medios líquidos, semi-sólidos y sólidos, empleando diferentes concentraciones de agar.

Medio de cultivo natural: Se esterilizaron 200 mL de muestra con agua – sedimento recolectado en el sitio de muestreo como base para el medio de cultivo de MTBs. A este medio se le adicionó solución de vitaminas, minerales y cloruro férrico.

El pH de los medios de cultivo se llevó a 6.5 con NaOH. Cada medio se inoculó con 1 mL de una solución de bacterias de concentración aproximada de 10^3 MTBs/mL. Las muestras se incubaron en la oscuridad, a temperatura ambiente, bajo condiciones de microaerofilia, por 8 días, luego de los cuales se analizó la actividad magnética, por espacio de 1 mes.

Cultivos enriquecidos: Se enriquecieron 15 muestras de 600mL, con y sin presencia de MTBs, obtenidas en la represa de La Fe y el embalse del Peñol, adicionando 1mL de solución de vitaminas, 1mL de solución de minerales y 1mL de cloruro férrico. Los cultivos enriquecidos se incubaron por 12 semanas en condiciones de microaerofilia, baja luminosidad y temperatura ambiente (25 °C).

La tabla 2 muestra la matriz experimental empleada en enriquecimiento de las muestras.

	FeCl ₃	SV-M	FeCl ₃ y SV-M
M1-M5	Si	-	-
M6-M10	-	Si	-
M11-M15	-	-	Si

Tabla 2. Matriz de las muestras enriquecidas. M: Muestras; SV-M: Solución de vitaminas y minerales.

Se realizó un seguimiento del crecimiento bacteriano durante las 12 semanas de incubación. Para ello se realizó el procedimiento de aislamiento citado previamente, determinando la concentración aproximada de MTBs presentes en las muestras. Las MTBs de cada cultivo se suspendieron en 50µl de agua destilada, con la ayuda de un magneto, evitándose la formación de aglomerados celulares, con el propósito de realizar un conteo estimado del número de células por mL en cámara de Neubauer.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias con propiedades magnéticas

Transcurridas las 4 semanas de reposo se observó presencia de microorganismos con propiedades magnéticas

en muestras de la represa de La Fe y el embalse de El Peñol. Las muestras del embalse El Peñol – Guatapé presentaron MTBs Gram-negativas tipo coco, en menor concentración a las MTBs obtenidas de la represa de La Fe, donde se observó bacterias Gram-negativas con morfología cocoide y bacilar (figura 2a y b). Se observaron bacterias bacilares curvadas de tamaños entre 4.6 – 6.5µm de largo por 1.18 – 1.6µm de ancho; cocos con tamaños oscilantes entre 1.9 – 2.34µm x 1.66 – 2.00µm.

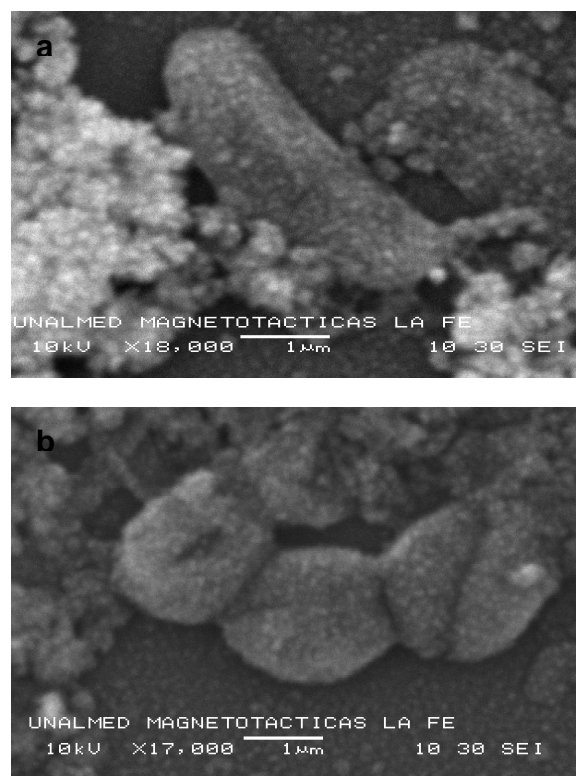


Figura 2. MTB vistos con SEM. a) Bacilos, 18000 X. b) Cocos 17000X

En general, las bacterias presentaron una migración hacia el polo norte magnético, con repulsión del polo sur de la barra magnética, sin embargo se observó que algunas de los MTB presentaron atracción por el polo sur y repulsión por el norte, lo cual se justifica por el hecho de que Colombia esta situada cerca a la línea ecuatorial, por tanto puede ser posible encontrar bacterias que se dirijan hacia los dos polos geomagnéticos.

Los microorganismos observados concuerdan con lo revisado en la literatura, donde se describen a las MTBs como un grupo heterogéneo de procariotes, con gran variedad de tipos morfológicos, que incluyen cocos, bacilos, vibrios, espirilos y aparentemente formas multicelulares, con bacilos de 5µm y cocos de aproximadamente 1µm en tamaño [4,5,13,14,15,16], que constituyen las comunidades microbianas naturales en sedimentos y columnas de agua estratificadas.

Crecimiento de bacterias magnetotácticas

Cultivo químico definido: En los medios sintéticos usados para el crecimiento de MTBs se observó un abundante crecimiento de bacterias con morfología cocoidal, bacilar y espiralada, Gram negativos, similar al inóculo bacteriano, pero ninguno de estos microorganismos manifestó comportamiento magnetotáctico, sugiriendo que para el crecimiento de estas bacterias las condiciones que se generan en el ambiente acuático son esenciales para el desarrollo de MTBs con comportamiento magnético y ayudan a que las bacterias controlen el proceso biogénico magnetita o greigita.

Medio de cultivo natural: No hubo ningún crecimiento significativo de MTBs en los medios de cultivo naturales a lo largo del periodo de incubación. Al cabo de 12 semanas, se observó una reducida concentración de MTBs de aprox. 10^2 MTBs / mL en algunos de los medios inoculados. Esto indica que los medios naturales utilizados en este estudio no suplen los requerimientos necesarios para el crecimiento óptimo de MTBs, a pesar de tratarse de medios con sedimento y agua del sitio de muestreo, lo que conlleva a concluir que al esterilizar el medio se está generando desnaturalización de compuestos vitales para el crecimiento de las MTBs.

Por otro lado, se puede deducir que la flora microbiana acompañante en las muestras juega un papel primordial en el desarrollo de las MTBs, al llevar a cabo procesos metabólicos que generan intercambio de electrones en el ecosistema, de los cuales microorganismos como las MTBs hacen uso. Así, al no tener presencia de otros microorganismos no se ve favorecido el crecimiento de MTBs, a pesar de la disponibilidad de nutrientes.

Cultivos enriquecidos: A diferencia de los medios de cultivo sintético y natural, en las muestras enriquecidas se obtuvo un aumento en la concentración de bacterias magnetotácticas en muestras con MTBs previo al enriquecimiento, así: luego de 12 semanas de incubación, se observó un aumento significativo en la concentración de MTBs en muestras positivas a las que se les adicionó FeCl_3 y SV-M (figura 3a y b); en las muestras positivas a las que se le adicionó únicamente FeCl_3 , el aumento en la concentración de dichas bacterias fue reducido; mientras que en el grupo de MTBs a las que se les adicionó SV-M, se observó aumento en la población bacteriana, sin incremento en la población de bacterias que presentan magnetotaxis.

Por otro lado, las muestras que al iniciar el enriquecimiento eran negativas para MTBs, no mostraron presencia de este tipo de bacterias, sin embargo se evidenció un incremento en la flora bacteriana en general.

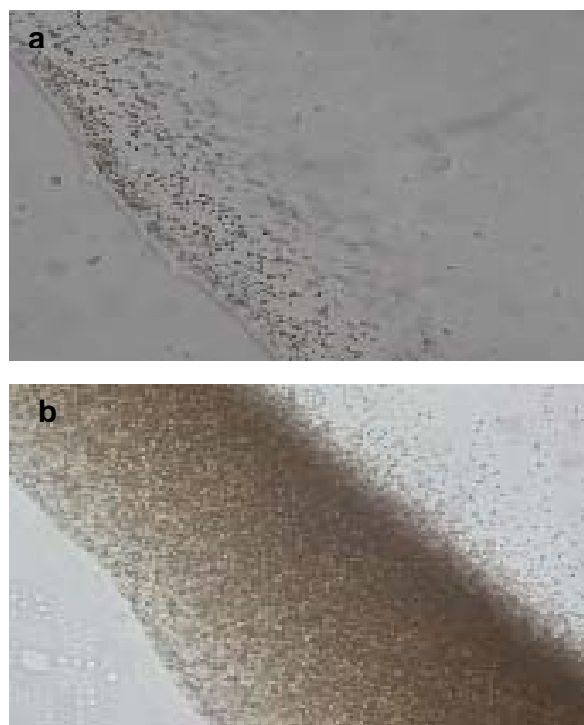


Figura 3. MTBs en muestras enriquecidas con FeCl_3 y SV-M. a) Antes del enriquecimiento. b) Después de las 4 semanas de incubación (aumento 100X).

Las concentraciones aproximadas de MTBs, antes y después del tiempo de incubación, para algunas muestras en los medios de cultivo enriquecidos, se presentan en la tabla 3.

La morfología de las MTBs obtenidas con el enriquecimiento de las muestras fue similar a las MTBs presentes inicialmente, provenientes de la represa de La Fe y el embalse de El Peñol; la proporción de MTBs cocos respecto a los bacilos también se mantuvo constante, lo que significaría que ninguna de las bacterias que en su ambiente natural no tenían comportamiento magnetotáctico se transformó en MTB durante el almacenamiento o el cultivo.

	Ci (MTBs/mL)	Cf (MTBs/mL)
M6	10^3	0
M10	0	0
M1	10^3	10^2
M5	0	0
M11	10^3	10^7
M15	0	0

Tabla 3. Concentración de MTBs antes y después del tiempo de incubación. M: Muestras, Ci: concentración inicial de MTBs, Cf: concentración final de MTBs.

Varias de las muestras M6 – M10 con presencia de MTBs y sin ella, al iniciar el tratamiento, mostraron presencia de bacterias con morfología cocoide, similar a las MTBs pero sin comportamiento magnetotáctico. Este hecho plantea la posibilidad de que la disponibilidad de una fuente de hierro induce a que las MTBs sinteticen sus cristales magnéticos intracelulares, (magnetita o greigita). Un estudio más detallado sobre la morfología de los tipos de bacterias encontrados en ambos casos podría arrojar luces sobre el tema.

Seguimiento del crecimiento de MTBs

El comportamiento de crecimiento que se observó para las MTBs durante los tiempos de almacenamiento e incubación de las muestras procedentes de su ambiente natural, contribuye al entendimiento de la ecología de las mismas. La baja concentración de MTBs observada el primer día de almacenamiento (aprox. 10^2 MTBs / mL) sugiere que en su ambiente natural la población de estas bacterias es muy reducida respecto al total de la población microbiana autóctona de las zonas de muestreo. Durante las primeras 4 semanas de almacenamiento previas al enriquecimiento, se observó un aumento progresivo de la concentración de MTBs y una reducción, en tamaño y diversidad, de la fauna microbiana no magnetotáctica del microambiente. Esto indica que las condiciones de almacenamiento favorecen el crecimiento de las MTBs más que cualquier otro microorganismo presente en las muestras. Dadas las variaciones en la concentración de MTBs a lo largo del periodo de incubación, puede afirmarse que después de las 4 semanas se inicia un estado de crecimiento exponencial, en el que se suprime gran parte de la flora acompañante.

Durante la incubación de las muestras enriquecidas M11 – M15, en las que hubo un aumento significativo en la población de MTBs (figura 3), la concentración de microorganismos no magnetotácticos fue muy reducida; mientras que en las muestras donde el crecimiento de MTBs fue muy bajo o inexistente (M1 – M10), hubo una mayor concentración de microorganismos no magnetotácticos. Este hecho plantea que la relación de competencia entre las especies de microorganismos autóctonos de las zonas de muestreo es muy fuerte y por lo tanto un factor determinante en el cultivo de MTBs.

En todas las muestras y medios de cultivo observados predominó la población de MTBs cocoidales sobre las bacilares. Hubo casos en los que la magnetotaxis solo se manifestó en bacterias de forma cocoidal, que puede deberse a que las condiciones ambientales, la disponibilidad de los nutrientes y/o la relación de competencia, favorece el crecimiento de MTBs tipo cocos.

Es importante resaltar que durante los procesos de síntesis de material magnético, magnetita (Fe_3O_4) o (Fe_3S_4), son fundamentales los gradientes de azufre y oxígeno, y la razón $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Marius *et al.* 2005 [17] afirma que la valencia del hierro influye en susceptibilidad magnética del mineral producido por la bacteria y altas razones de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ producen alta cantidad de sulfuros magnéticos. Por otro lado, las condiciones ambientales afectan la biomineralización de la fase mineral en el magnetosoma, puesto que se presentan cambios en la estequiometría de los componentes metálicos y no metálicos de la fase mineral [18], por tanto, para el cultivo de MTBs y síntesis del mineral magnético es necesario controlar los requerimientos energéticos y de oligoelementos en el ambiente de crecimiento bacteriano, que permita la formación de gradientes en el microcosmos a formar.

4. CONCLUSIONES

Las condiciones a las que se almacenaron las muestras favorecen el crecimiento de las MTBs más que a cualquier otro microorganismo presente en ellas. Las MTBs cocoidales predominan sobre las bacilares, tanto en su ambiente natural como en los medios de enriquecimiento utilizados en este estudio. La relación de competencia entre las especies de microorganismos autóctonos de las zonas de muestreo es muy fuerte y es un factor determinante en el cultivo de MTBs. Los medios de cultivo sintético y natural utilizados en este estudio no suplen los requerimientos necesarios para el crecimiento óptimo de MTBs.

A pesar de los resultados positivos en el proceso de enriquecimiento de muestras con MTBs, las condiciones y medios de cultivo antes mencionadas, no brindan los requerimientos suficientes para el éxito en el cultivo puro de MTBs puesto que el ecosistema que rodea a estos microorganismos es bastante complejo, debido a la cantidad de reacciones generadas por otros organismos parásitos y por procesos simbióticos entre la MTB y otros organismos, haciendo imposible la imitación total del ambiente bacteriano.

La continuidad de estudios como este dará luces sobre la(s) metodología(s) apropiada(s) para la obtención de bacterias magnetotácticas en altas concentraciones y por lo tanto para la producción de grandes cantidades de cristales magnéticos biogénicos, de interés a nivel nanotecnológico y en un futuro se pueda hacer uso de este material en procesos industriales que beneficien a la sociedad.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa Nacional de Biotecnología de Colciencias por la financiación de este

proyecto. A Empresas Públicas de Medellín (EPPM) Y Confamiliar COMFENALCO por autorizar el muestreo y facilitar la logística en la represa de la Fe; al laboratorio de Biomineralogía de la Universidad Nacional, Sede Medellín.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] T. Moench, and W. A. Konetzka, "A novel method for the isolation and study of a magnetotactic bacterium," *Arch. Microbiol.*, vol. 119, pp. 203–212. 1978
- [2] R. P. Blakemore, "Magnetotactic bacteria," *Ann. Rev. Microbiol.*, vol. 36, pp. 217–238. 1982.
- [3] D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, B. R. Heywood, S. Mann, J. W. King, P. L. Donaghay, and A. K. Hanson, "Controlled biomineralization of magnetite (Fe_3O_4) and greigite (Fe_3S_4) in a magnetotactic bacterium," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, pp. 3232–3239. 1995.
- [4] R. P. Blakemore, D. Maratea, and R. S. Wolfe, "Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium," *Journal of Bacteriology*, vol. 140, pp. 720 – 729, 1979.
- [5] D. Schuler, and E. Baeuerlein, "Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in *Magnetospirillum gryphiswaldense*," *Arch. Microbiol.*, vol. 166, pp. 301–307, 1996.
- [6] D. Bazylinski, and S. Spring, "Magnetotactic bacteria," 2000 available: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/281/complete.htm>
- [7] R. P. Blakemore, "Magnetotactic bacteria," *Science*, vol. 190, pp. 377–379, 1975.
- [8] R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, M. S. Johnson, and B. L. Taylor, "Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria," *Biophys. J.*, vol. 73, pp. 994–1000, 1997.
- [9] D. A. Bazylinski, and R. B. Frankel, "Biologically controlled mineralization in prokaryotes," *Rev Mineral.*, vol. 54, pp. 95 – 114, 2003.
- [10] N. Adelman, P. Berger, K. Beckman, D. Cambell, and A. Ellis, "Preparation and properties of an aqueous ferrofluid," *J. ChemEd.*, vol. 76, N°. 7, pp. 943, 1999.
- [11] K. Hirao, T. Sugita, T. Kubo, K. Igarashi, K. Tanimoto, T. Murakami, Y. Yasunaga, and M. Ochi, "Targeted gene delivery to human osteosarcoma cells with magnetic cationic liposomes under a magnetic field," *International journal of oncology*, vol. 22, pp. 1065 – 1071, 2003.
- [12] E. Wajnberg, L. Salvo de Souza, H. Lins de Barros, and D. Esquivel, "A study of magnetic properties of magnetotactic bacteria," *Biophys J.*, pp. 451–455, 1986.
- [13] E. A. Matitashvili, D. A. Matojan, T. S. Gendler, T. V. Kurzchalia, R. S. Adamia, "magnetotactic bacterias from fresh waters lakes in Georgia," *J. Basic Microbiol.*, vol. 32, pp. 185 – 192, 1992.
- [14] S. Spring, R. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, K.H. H. V. Gemerden, and N. Petersen, "Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, pp. 2397 – 2403, 1993.
- [15] D. A. Bazylinski, A. Garratt-Reed, and R. B. Frankel, "Electron-microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria," *Microscopy Res. Tech.*, vol. 27, pp. 389–401, 1994.
- [16] A. Iida, and J. Akai, "Crystalline sulfur inclusions in magnetotactic bacteria," *Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. E (Geology)*, vol. 11, pp. 35–42, 1996.
- [17] M. S. Marius, P. A. James, A. S. Bahaj, and D. J. Smallman, "Influence of iron valency on the magnetic susceptibility of a microbially produced iron sulphide," *Journal of Physics: Conference Series* 17, pp. 65 – 69, 2005.
- [18] S. L. Simmons, S. M. Sievert, R. B. Frankel, D. A. Bazylinsky, and K. J. Edwards, "Spaciotemporal Distribution of Marine Magnetotactic Bacteria in a Seasonally Stratified Coastal Salt Pond," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, No. 10, pp. 6230 – 6239, 2004.