

OEBER DE FREITAS QUADROS

**CONSTRUÇÃO DE SISTEMAS
BACTERIANOS PARA A DETECÇÃO
DE METAIS PESADOS EM
AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2011

OEBER DE FREITAS QUADROS

**CONSTRUÇÃO DE SISTEMAS
BACTERIANOS PARA A DETECÇÃO
DE METAIS PESADOS EM
AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete José Vicente

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Quadros, Oeber de Freitas.

Construção de sistemas bacterianos para a detecção de metais pesados em amostras ambientais / Oeber de Freitas Quadros. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Elisabete José Vicente.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genética molecular e de microrganismos.

Versão do título para o inglês: Construction of bacterial systems of the detection of heavy metals in environmental samples.

Descritores: 1. Bioluminescência 2. Meio ambiente 3. Biotecnologia 4. Regulação gênica 5. Metais pesados 6. Bactérias I. Vicente, Elisabete José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0165/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: Oeber de Freitas Quadros.

Título da Tese: Construção de sistemas bacterianos para a detecção de metais pesados em amostras ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete José Vicente.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou-o

Aprovado **Reprovado**

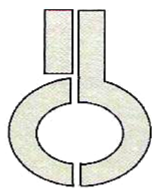
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 446/11 referente ao projeto intitulado: "*Construção de sistemas bacterianos para a detecção de metais pesados em amostras ambientais*" sob a responsabilidade de **Oeber de Freitas Quadros**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 23 de março de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*À minha esposa Cristiele pelos anos de amor, companheirismo,
dedicação, paciência, estímulo e ajuda.
Ao meu filho Cauê, que na sua inocência de criança, tem me ajudado a entender que as
coisas mais simples da vida são aquelas que mais valorizamos e jamais esquecemos.*

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por dar-me vida e saúde para conquistar mais uma vitória. A Ele seja dada toda honra e glória!

À professora e orientadora Dr^a. Elisabete José Vicente, pela experiência transmitida, pelo incentivo nas horas difíceis, amizade, confiança, encorajamento, paciência e oportunidade.

À Prof^a. Dr^a. Ana Clara Guerrini Schenberg, presidente do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, por todo apoio dedicado.

À Companhia Vale do Rio Doce (CVRD), pelo auxílio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

Aos meus pais Carlos e Orfélia, pela dedicação e esforço imensuráveis para que eu tivesse uma boa educação.

Aos colegas de laboratório: Ana Cristina, Belisa, Carolina, Cecília, Claudionor, Cleide, Diogo, Fábio, Felipe, Ilana, Jéssica, Poliana, Raquel, Ronaldo e Thais pela troca de idéias, orientações e conselhos que muito me ajudaram na realização deste trabalho.

Às funcionárias: Kazui, Maria Normandia (Norma) e Maria Helena, por proporcionarem todo apoio técnico necessário.

Aos secretários Marcos, Eliane e Fábria do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, pela paciência e compreensão.

“A maior necessidade do mundo é a de homens; homens que não se comprem nem se vendam; homens que no íntimo da alma sejam verdadeiros e honestos; homens que não temam chamar o pecado pelo seu nome exato; homens cuja consciência seja tão fiel ao dever como a bússola o é ao pólo; homens que permaneçam firmes pelo que é reto, ainda que caiam os céus.”

Ellen Gould White

RESUMO

Quadros OF. Construção de sistemas bacterianos para a detecção de metais pesados em amostras ambientais. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Para a obtenção de biossensores bacterianos para os metais mercúrio, arsênio e chumbo, fragmentos dos operons *mer*, *ars* e *pbr* foram amplificados por PCR, a partir do DNA da bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34. Estes fragmentos de DNA foram inseridos à montante do gene *EGFP*, no plasmídeo pBB-EGFP, obtendo-se os plasmídeos pGHg, pGAs e pGPb, que foram clonados em *C. metallidurans* CH34 e *Escherichia coli* DH5 α . As linhagens recombinantes foram incubadas em diferentes concentrações dos metais e analisadas quanto à emissão de fluorescência empregando-se microscopia e citometria de fluxo. As linhagens recombinantes *C. metallidurans* CH34 / pGHg e *E. coli* DH5 α / pGHg, *C. metallidurans* CH34 / pGAs e *C. metallidurans* CH34 / pGPb permitiram a determinação de diferentes concentrações de mercúrio, arsênio e chumbo, respectivamente. Os resultados obtidos indicam forte potencial de aplicação para rápidos diagnósticos de águas contaminadas com estes metais pesados tóxicos.

Palavras-chave: Bactérias. Bioluminescência. Biotecnologia. Meio ambiente. Metais pesados. Regulação gênica.

ABSTRACT

Quadros OF. Construction of bacterial systems for the detection of heavy metals in environmental samples. [Ph. D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

To obtain bacterial biosensors for metals mercury, arsenic and lead, fragments of operons *mer*, *ars*, and *pbr* were amplified by PCR from the DNA of the bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34. These DNA fragments were inserted upstream of the *EGFP* gene in the pBB-EGFP plasmid, obtaining plasmids pGHg, pGAs and pGPb, which were cloned in *C. metallidurans* CH34 and *E. coli* DH5 α . The recombinant strains were incubated in different concentrations of metals and analyzed for fluorescence emission employing microscopy and flow cytometry. The recombinant strains *C. metallidurans* CH34/pGHg and *E. coli* DH5 α /pGHg; *C. metallidurans* CH34/pGAs; and, *C. metallidurans* CH34/pGPb allowed the determination of different concentrations of mercury, arsenic and lead, respectively. The results indicate strong potential for application for quick diagnosis of waters contaminated with these toxic heavy metals.

Keywords: Bacteria. Bioluminescence. Biotechnology. Environment. Gene regulation. Heavy metals.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – O potencial tóxico dos metais pesados ao organismo humano e as principais fontes poluidoras.....	22
Tabela 2 – Componentes biológicos empregados na construção de biossensores baseados em microrganismos geneticamente modificados.....	26
Tabela 3 – Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.....	41
Tabela 4 – Sequência dos oligonucleotídeos empregados para amplificação por PCR.....	42
Tabela 5 – Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	42
Tabela 6 – Capacidade de quantificação dos biossensores bacterianos construídos neste trabalho.....	76
Tabela 7 – Comparação dos valores obtidos neste trabalho com valores de outros autores.....	77

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferentes metodologias e equipamentos utilizados na detecção e/ou quantificação de sinais gerados pelos biossensores.....	24
Figura 2 – Esquema da construção de um biossensor bacteriano.....	25
Figura 3 – Representação esquemática da Proteína Verde Fluorescente.....	28
Figura 4 – Esquema do plasmídeo pBB-EGFP.....	29
Figura 5 – Representação esquemática de operons <i>mer</i> de diferentes bactérias.....	32
Figura 6 – Representação esquemática do sistema de resistência a Hg ²⁺ em <i>C. metallidurans</i> CH34. Na parte inferior da figura estão representados os genes do operon <i>mer</i> presente nos plasmídeos pMOL28 e pMOL30 e na região cromossomal. As flechas indicam o sentido de transcrição dos genes. Na parte superior da figura estão indicadas as possíveis proteínas codificadas. Íons Hg ²⁺ (•) são transportados para o interior da célula pelas proteínas MerP/MerT. MerA reduz íons Hg ²⁺ a Hg ⁰ , utilizando NADPH. O mercúrio metálico (Hg ⁰) é volátil e difunde-se para o meio exterior da célula. Íons Hg ²⁺ livres ligam-se à MerR, provocando alteração da conformação MerR-MerD e conseqüentemente ativação do operon.....	33
Figura 7 – Esquema da organização do operons <i>ars</i> de: A) <i>E. coli</i> : plasmídeo R773 e cromossômico de <i>E. coli</i> K12 e do plasmídeo pI258 de <i>Staphylococcus</i> spp.; B) Operon <i>ars</i> do cromossomo 1 de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	35
Figura 8 – A) Modelo do operon <i>pbr</i> de <i>C. metallidurans</i> CH34 que codifica resistência aos íons Pb ²⁺ . Estão indicados os genes: <i>pbrT</i> (captura de Pb ²⁺), <i>pbrR</i> (regulador do operon), <i>pbrA</i> (ATPase do efluxo de Pb ²⁺), <i>pbrB</i> (função ainda desconhecida), <i>pbrC</i> (peptidase sinal), <i>pbrD</i> (seqüestro de Pb ²⁺). B) Parte da seqüência do operon <i>pbr</i> do plasmídeo pMOL30 de <i>C. metallidurans</i> CH34, destacando o início e o fim do gene <i>pbrR</i> e a região operadora/promotora.....	37
Figura 9 – A) Esquema da construção do plasmídeo pTZ-Mer; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA analisados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/μL (Fermentas); 2 e 4: pTZ-Mer digerido com <i>NdeI</i> ; 3 e 5: pTZ-Mer digerido com <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	55

Figura 10 – A) Esquema da construção do plasmídeo pTZ-Mer e gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde 1: Ladder 1Kb Fermentas, 2: pTZ-Mer digerido com <i>NdeI</i> , 3 e 4: pTZ-Mer digerido com <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> ; B) Esquema da construção do plasmídeo biossensor de íons mercúrio pGHg; C) Perfis de migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde 1: Ladder 1Kb Fermentas, 2: pGHg digerido com <i>NdeI</i> , 3: pGHg digerido com <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> , 4: pGHg digerido com <i>XhoI</i> e <i>BamHI</i> ; D) Células recombinantes de <i>E. coli</i> DH5 α / pGHg fluorescendo na presença de mercúrio (aumento de 1000X, microscopia de fluorescência, utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio).....	56
Figura 11 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>C. metallidurans</i> CH34/pGHg inoculado em H ₂ O, com diferentes concentrações de HgCl ₂ , no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 28 °C.....	58
Figura 12 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>C. metallidurans</i> CH34/pGHg inoculado em Caldo Nutriente, com diferentes concentrações de HgCl ₂ , no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 28 °C.....	58
Figura 13 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>E. coli</i> DH5 α /pGHg inoculado em H ₂ O, com diferentes concentrações de HgCl ₂ , no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 37 °C.....	59
Figura 14 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>E. coli</i> DH5 α /pGHg inoculado em Caldo Nutriente, com diferentes concentrações de HgCl ₂ , no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 37 °C.....	59
Figura 15 – A) Esquema da construção do plasmídeo pTZ-Ars; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA analisados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/ μ L (Fermentas); 2: pTZ-Ars digerido com <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i> ; 3: pTZ-Ars digerido com <i>NdeI</i>	61
Figura 16 – A) Esquema da construção dos plasmídeos pGAs; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/ μ L (Fermentas); 2 pGAs-Cm não digerido; 3: pGAs-Cm digerido com <i>NdeI</i> ; 4- pGAs-Cm digerido com <i>NdeI</i> e <i>SacI</i>	62
Figura 17 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>C. metallidurans</i> CH34/pGAs inoculado em H ₂ O, em concentrações variadas de Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O, no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 28 °C..	64
Figura 18 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>C. metallidurans</i> CH34/pGAs inoculado em Caldo Nutriente, em concentrações variadas de Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O, no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 28 °C.....	64

Figura 19 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>E. coli</i> DH5 α CH34/pGAs inoculado em H ₂ O, em concentrações variadas de Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O, no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 37 °C.....	65
Figura 20 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>E. coli</i> DH5 α CH34/pGAs inoculado em Caldo Nutriente, em concentrações variadas de Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O, no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 37 °C.....	65
Figura 21 – A) Esquema da construção do plasmídeos pTZ-Pbr; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1 e 8: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/ μ L (Fermentas); 2 a 7 pTZ-Pbr digeridos, sendo: 2- <i>Nde</i> I; 3- <i>Nde</i> I e <i>Sac</i> I; 4- <i>Nde</i> I e <i>Xba</i> I; 5- <i>Xba</i> I; 6- <i>Bam</i> HI.; 7- <i>Nde</i> I e <i>Bam</i> HI.....	67
Figura 22 – A) Esquema da construção do plasmídeo pGPb; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/ μ L (Fermentas); 2 a 8 plasmídeos pGPb digeridos com <i>Nde</i> I	68
Figura 23 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>C. metallidurans</i> CH34/pGPb inoculado em H ₂ O, em concentrações variadas de Pb(NO ₃) ₂ , no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 28 °C.....	70
Figura 24 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>C. metallidurans</i> CH34/pGPb inoculado em Caldo Nutriente, em concentrações variadas de Pb(NO ₃) ₂ , no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 28 °C.....	70
Figura 25 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>E. coli</i> DH5 α /pGPb inoculado em H ₂ O, em concentrações variadas de Pb(NO ₃) ₂ , no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 37 °C.....	71
Figura 26 – Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone <i>E. coli</i> DH5 α /pGPb inoculado em Caldo Nutriente, em concentrações variadas de Pb(NO ₃) ₂ , no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 37 °C	71
Figura 27 – Ilustração da técnica empregada onde as regiões operadora/promotoras e os genes sensores foram clonados à montante da região estrutural do gene <i>EGFP</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp: ampicilina

Cm: gene que confere resistência ao cloranfenicol

DNA: ácido desoxirribonucléico (“Deoxyribonucleic acid”)

dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfatados (“Deoxynucleotide triphosphates”)

EcoRI: endonuclease de restrição I de *Escherichia coli* RY13

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético (“Ethylene diamine tetracetic acid”)

EGFP: proteína verde fluorescente realçada (“enhanced green fluorescent protein”)

FACS: “Fluorescence-Activated Cell-Sorting”

GFP: gene codificador da proteína verde fluorescente (“green fluorescent protein”)

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (“Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside”)

lacZ: gene codificador da β -D-galactosidase

LB: meio de cultura Luria-Bertani

luc: gene codificador da luciferase em eucariotos

lux: gene codificador da luciferase em procariotos

MCS: múltiplo sítio de clonagem

merA: gene codificador da proteína reductase MerA

merD: gene codificador da proteína MerD (regulação secundária do operon Mer)

merP: gene codificador da proteína periplasmática MerP (se liga ao íon mercúrio)

merR: gene codificador da proteína MerR (ativadora/repressora do operon *mer*)

merT: gene codificador da proteína MerT de transporte do íon mercúrio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NdeI: endonuclease de restrição I de *Neisseria denitrificans*

o/p: região operadora / promotora de uma operon

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

PstI: endonuclease de restrição I de *Providencia stuartii* 164

RNase: ribonuclease

SacI: endonuclease de restrição I de *Streptomyces achromogenes*

SacII: endonuclease de restrição II de *Streptomyces achromogenes*

SalI: endonuclease de restrição I de *Streptomyces albus* G

SDS: dodecil sulfato de sódio (“sodium dodecyl sulfate”)

SOC: meio de cultura para transformação bacteriana (“Super Optimal Catabolite”)

TBE: tampão Tris, ácido bórico e EDTA

TE: tampão Tris e EDTA

Tris: tris-hidroximetil-aminometano (“trishydroxymethylaminomethane”)

UV: radiação ultravioleta

X: vezes

XGal: 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-Galactopiranosídeo

XhoI: endonuclease de restrição I de *Xanthomonas holcicola*

LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem

~ : aproximadamente

°C: graus Celsius

μFD: microfarad (capacitância)

μg: micrograma

μL: microlitro

μM: micromol

Å: angstrom

As²⁺: íon arsênio

Cd²⁺: íon cádmio

Co²⁺: íon cobalto

CrO₄⁻²: íon cromato

Cu²⁺: íon cobre

EGFP: proteína verde fluorescente realçada (“enhanced green fluorescent protein”)

g: força centrífuga relativa à aceleração padrão de gravidade

h: horas

HCl: ácido clorídrico

Hg²⁺: íon mercúrio

HgCl₂: cloreto de mercúrio

kb: quilo bases

KDa: quilo Dalton

L: litro

M: mol

mg/L: miligramas por litro

mg: miligrama

MgCl: cloreto de magnésio

mL: mililitro

mM: milimol

Mn²⁺: íon manganês

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

nM: nanomol

Pb²⁺: íon chumbo

pM: picomol

Se²⁺: íon selênio

U²⁺: íon urânio

V: volts

Zn²⁺: íon zinco

Ω: ohms (resistência)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Problemática	21
1.2 Biossensores	23
1.3 Biossensores Bacterianos	23
1.4 Genes repórteres	25
1.5 A Proteína Verde Fluorescente (GFP)	28
1.6 Genes biossensores de metais pesados	30
1.7 Operon <i>mer</i>	31
1.8 Operon <i>ars</i>	34
1.8 Operon <i>pbr</i>	36
2 OBJETIVOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Material biológico	41
3.2 Reagentes e soluções	43
3.3 Meios de cultura e condições de crescimento bacteriano	44
3.4 Agentes antimicrobianos	44
3.5 Enzimas	44
3.6 Extração e purificação de DNA plasmidial de <i>E.coli</i>	45
<u>3.6.1 Minipreparação de DNA plasmidial – “MiniPrep”</u>	45
<u>3.6.2 Maxipreparação de DNA plasmidial – “MaxiPrep”</u>	45
3.7 Isolamento e manipulação de megaplasmídeo	46
3.8 Análise do DNA em gel de agarose	47
3.9 Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose	47
3.10 Ligação de fragmentos de DNA	48
3.11 Preparo de células bacterianas competentes	48
3.12 Transformação de bactérias por eletroporação	49
3.13 Amplificação de fragmentos de DNA por PCR	49
3.14 Avaliação biológica das bactérias recombinantes com os metais pesados	50
<u>3.14.1 Mercúrio</u>	50
<u>3.14.2 Arsênio</u>	50
<u>3.14.3 Chumbo</u>	51

3.15 Microscopia de Fluorescência	52
3.16 Citometria de Fluxo	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Biossensor de Mercúrio	54
4.1.1 <u>Construção do plasmídeo pGHg – Biossensor de Hg²⁺</u>	54
4.1.2 <u>Análise quantitativa da expressão do gene <i>EGFP</i> dos clones recombinantes</u> <u><i>E. coli</i> DH5α / pGHg e <i>C. metallidurans</i> CH34 / pGHg</u>	57
4.2 Biossensor de Arsênio	60
4.2.1 <u>Construção do plasmídeo pGAs – Biossensor de As³⁺</u>	60
4.2.2 <u>Análise quantitativa da expressão do gene <i>EGFP</i> dos clones recombinantes</u> <u><i>E. coli</i> DH5α / pGAs e <i>C. metallidurans</i> CH34 / pGAs</u>	62
4.3 Biossensor de Chumbo	66
4.3.1 <u>Construção do plasmídeo pGPb – Biossensor de Pb²⁺</u>	66
4.3.2 <u>Análise quantitativa da expressão do gene <i>EGFP</i> dos clones recombinantes</u> <u><i>E. coli</i> DH5α / pGPb e <i>C. metallidurans</i> CH34 / pGPb</u>	69
5 DISCUSSÃO	72
5.1 Expressão do gene <i>EGFP</i> nos três biossensores bacterianos	73
5.2 Operons específicos de resistência são viáveis para a obtenção de biossensores	74
5.3 Tempo de inoculação e leitura das amostras	75
5.4 Viabilidade de inoculação dos biossensores bacterianos em água	75
5.5 Aplicabilidade na quantificação dos biossensores frente aos val referência	75
5.6 Considerações finais	77
6 CONCLUSÕES	78
6.1 Biossensor de Mercúrio	79
6.2 Biossensor de Arsênio	79
6.3 Biossensor de Chumbo	80
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problemática

O extrativismo mineral, atividades industriais, agropecuárias e esgotos domésticos são grandes responsáveis pela contaminação ambiental por metais pesados. O emprego de mercúrio metálico na extração de ouro em garimpos acarreta a liberação de toneladas deste metal tóxico no meio ambiente. Dados extraoficiais mostram que, nos últimos 15 anos, cerca de 1500 a 3000 toneladas de mercúrio metálico foram usadas na extração de ouro na Amazônia. Acredita-se que, do total empregado, mais de 62% foi lançado ao ambiente (Vieira e Passarelli, 1996). De um modo geral, a atividade de extração de minérios como ferro, cobre, alumínio e outros que se encontram naturalmente presentes em montanhas promovem a exposição ambiental de camadas soterradas há muitos milênios. Tal exposição promove a liberação, oxidação e, conseqüentemente, a solubilização e biodisponibilização de íons de metais pesados tóxicos para os veios de água.

Todos os metais e seus compostos possuem toxicidade, ou seja, a capacidade inerente que um elemento químico tem para causar efeitos adversos sobre os organismos vivos (Goyer, 1997). O fator-chave é o grau de exposição que afeta o organismo. A exposição está relacionada com o tempo e a concentração do composto envolvido. Os efeitos tóxicos dos metais pesados e dos seus compostos são determinados pela sua conversão em uma forma biodisponível. Ao ingressar no ambiente, o íon pode se ligar com a matéria orgânica, reduzindo a quantidade que está biodisponível (Muniz e Oliveira-Filho, 2006).

Várias definições de metais pesados podem ser encontradas na literatura; no entanto, há um consenso de que metais pesados sejam elementos químicos com densidade igual ou maior que 5 g/cm^3 (Nies, 1999; Piveli e Kato, 2005; Roane e Pepper, 2000). Considerando-se essa definição, muitos destes íons metálicos como ferro (Fe), molibdênio (Mo) e manganês (Mn) são importantes elementos-traço com baixa toxicidade, enquanto zinco (Zn), níquel (Ni), cobre (Cu), vanádio (V), cobalto (Co), tungstênio (W) e crômio (Cr) são de moderada importância como elementos-traço e apresentam toxicidade em concentrações pouco acima das fisiológicas. Por fim, arsênio (As), prata (Ag), antimônio (Sb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e urânio (U) não são essenciais para o crescimento celular, sendo extremamente tóxicos, mesmo em baixas concentrações (Nies, 1999).

A portaria nº 518 (Brasil, 2004) e a resolução nº 357 (CONAMA, 2005) dispõem sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos níveis de metais pesados em corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de potabilidade,

devido à sua toxicidade e persistência na natureza. O potencial tóxico dos metais pesados ao organismo humano é diverso e está resumido na Tabela 1, que mostra as principais fontes poluidoras e os efeitos na saúde humana (ICSCs, 2011).

Tabela 1 - O potencial tóxico dos metais pesados ao organismo humano e as principais fontes poluidoras.

Íon	Principais Fontes Poluidoras*	Efeitos no homem**	Potabilidade***
Arsênio (As)	Herbicidas, Inseticidas, Fungicidas, Mineração, Indústria de vidros, tintas e corantes.	Câncer, Intoxicação e Morte (130 mg).	0,01 mg/L (0,1335 mM)
Cádmio (Cd)	Efluentes industriais, Galvanoplastia, Produção de Pigmentos, Equipamentos eletrônicos, Lubrificantes, Acessórios fotográficos, Inseticidas e Combustíveis fósseis.	Anemia, Retardamento do crescimento, Morte (9 gramas), Disfunção renal, Hipertensão, Arteriosclerose, Câncer e Doenças crônicas.	0,005 mg/L (0,0445 mM)
Chumbo (Pb)	Efluentes industriais, Tabaco, Tintas, Tubulações, Metalurgia e Indústria de Eletrodeposição.	Saturnismo, Tontura, Irritabilidade, Dor de cabeça, Perda de memória, Deficiências musculares, Inflamação gastrointestinal, Vômitos e Diarréias.	0,01 mg/L (48,3 µM)
Cobalto (Co)	Indústrias Química, Cerâmica, Metalúrgica e de Óleo.	Doenças pulmonares, Bócio, colapso cardíaco e hipotireoidismo.	0,05 mg/L (0,85 mM)
Cobre (Cu)	Corrosão de tubulações, Esgotos domésticos, Algicidas, Fungicidas, Pesticidas, Mineração, Fundição e Refinamento de metais.	Lesões no fígado e Intoxicação.	2,0 mg/L (31,47 mM)
Crômio (Cr)	Efluentes industriais, Produção de alumínio e aço, Tintas, Pigmentos, Explosivos, Papel e Fotografia.	Alergias, Câncer e Intoxicação.	0,05 mg/L (0,962 mM)
Mercúrio (Hg)	Pescados, Garimpos, Praguicidas, Produção de cloro, Desinfetantes, Pigmentos, Mineração, Esgotos, Produtos odontológicos, Farmacêuticos e Tintas.	Morte (3-30 gramas), Vômitos, Dores abdominais, Diarréia, Osteoporose, Lesões cerebrais e renais, Alterações psicológicas e psicomotoras.	0,001mg/L (4,985 µM)
Níquel (Ni)	Galvanoplastias, Mineração, Queima de combustíveis fósseis, Fundição de metal, Produção de ligas metálica e Fabricação de alimentos.	Câncer, Dermatites, Alterações cardíacas e respiratórias.	0,025 mg/L (0,426 mM)
Zinco (Zn)	Galvanoplastias, Mineração, Combustão de madeira, Incineração de resíduos, Esgotos domésticos e Produção de ferro e aço.	Alterações respiratórias, gástricas e cardíacas.	5,0 mg/L (76,475 mM)

Fontes: *CUT-RJ (2000), ** ICSCs (2011), ***Ministério da Saúde - Portaria nº 518 (2004); CONAMA – Resolução nº 357 (2005)

A identificação da presença de metais pesados no ambiente pode ser realizada por ensaios químicos e/ou físico-químicos. Todavia, estes ensaios são laboriosos e caros. Uma

nova proposta para a determinação da contaminação ambiental de metais pesados consiste na utilização de biossensores que são capazes de, não só fornecer resultados quantitativos, como também mostrar a disponibilidade biológica (biodisponibilidade) e assim, o efeito tóxico destes poluentes sobre o meio ambiente (Ramanathan et al., 1997). Desta forma, o desenvolvimento de um biossensor metal-específico vem sendo considerado um recurso chave para caracterizar um ambiente contaminado com metais pesados, bem como monitorar as ações de remediação desta área (de Lorenzo e Kuenen, 1999; Weitz et al., 2001). Sendo assim, este trabalho propôs desenvolver biossensores bacterianos para a detecção de metais pesados em amostras ambientais.

1.2 Biossensores

Os biossensores podem ser definidos como dispositivos analíticos, cujo sistema de detecção da molécula-alvo é um componente biológico (Alfaya e Kubota, 2002). Os componentes biológicos podem ser organismos, tecidos, células, organelas, membranas, enzimas, receptores, anticorpos, ácidos nucleicos e macromoléculas orgânicas (Bhatia et al., 2000; Iwuoha et al., 2000; Turner et al., 1987; Zhang et al., 1991), que reconhecem a substância (Ex. íons de metais pesados) através de interações bioquímicas. Outro componente importante de um biossensor é o transdutor, que transforma o sinal biológico em um sinal analisável por um dispositivo físico-químico, gerando, por exemplo, a liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, entre outras (Mulchandani e Bassi, 1995). Os biossensores podem ser classificados em biossensores ópticos, eletroquímicos, potenciométricos, termométricos, enzimáticos e microbianos. Diferentes metodologias e equipamentos são utilizados na detecção e/ou quantificação de sinais gerados pelos biossensores (Figura 1). São atributos dos sistemas biossensores: especificidade, sensibilidade, confiabilidade, portabilidade, análise em tempo real e simplicidade na operação (D'Souza, 2001).

1.3 Biossensores Bacterianos

Biossensores bacterianos podem ser constituídos de microrganismos não modificados ou geneticamente modificados. Os biossensores com microrganismos não modificados geneticamente são empregados para análise de substâncias poluentes em amostras ambientais

e para determinação da demanda bioquímica de oxigênio (Lee et al., 1991, 1992). A aplicação mais comum de biossensores constituído de células microbianas naturais é a análise de toxicidade de amostras com organismos luminescentes como, por exemplo, o *Vibrio fischeri* e o *Photobacterium phosphoreum*. Em ambos organismos, a redução da intensidade da bioluminescência é utilizada para avaliar as alterações do metabolismo celular, quando o organismo é exposto a uma amostra ambiental, sendo a diminuição da intensidade da luz proporcional à toxicidade da amostra (Chang et al., 1981; Chatterjee e Meighen, 1995).

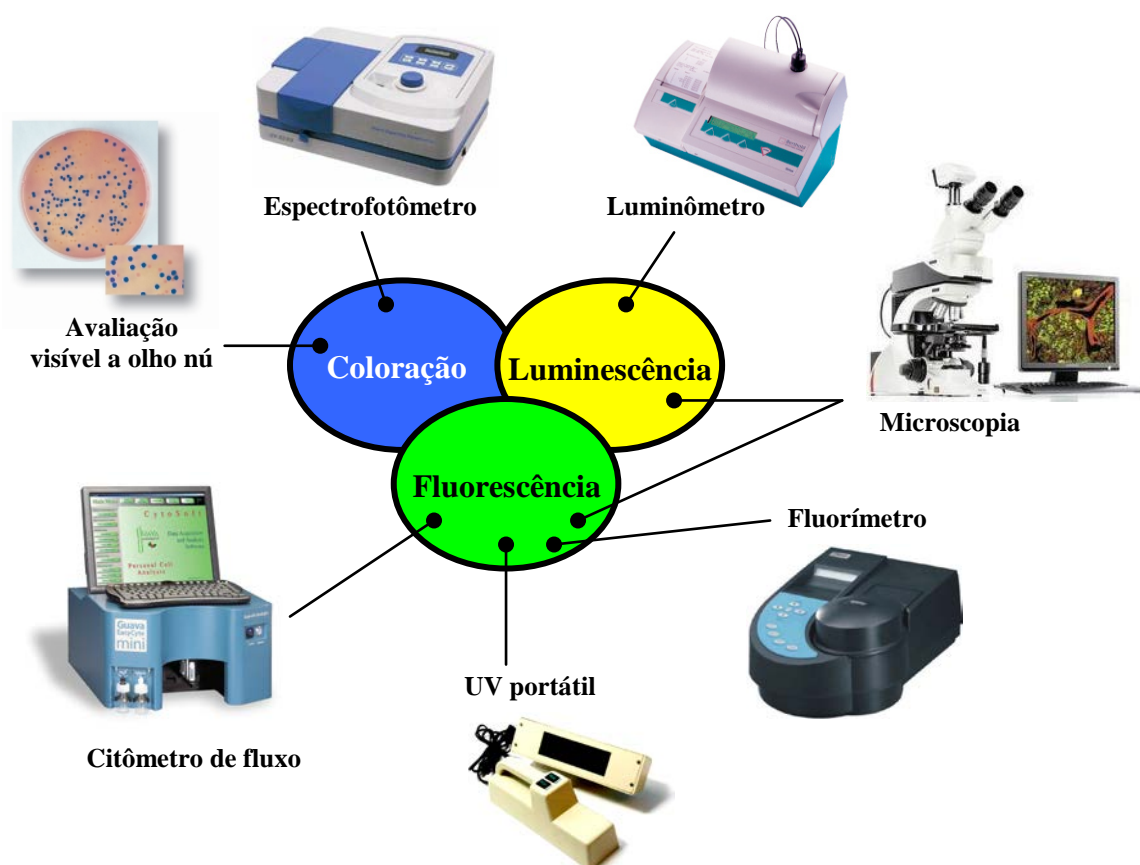


Figura 1 – Diferentes metodologias e equipamentos utilizados na detecção e/ou quantificação de sinais gerados pelos biossensores.

Por outro lado, microrganismos geneticamente modificados podem ser desenvolvidos para produzir sinais químicos, físicos ou biológicos, provenientes da produção de proteínas repórteres como a luciferase, β -galactosidase, fosfatase alcalina e proteínas fluorescentes (Tecon e Van der Meer, 2006).

Para a construção genética de um biossensor bacteriano são necessários alguns componentes: um operador/promotor (o/p), o gene sensor, codificador da proteína que regula a expressão do promotor de interesse e um terceiro componente, um gene repórter (Figura 2). A síntese da proteína repórter é normalmente regulada pelo operador/promotor (Tecon e Van der Meer, 2006). Na Tabela 2 são apresentados alguns componentes biológicos empregados na construção de microrganismos biossensores geneticamente modificados para detecção e quantificação de íons de metais pesados.

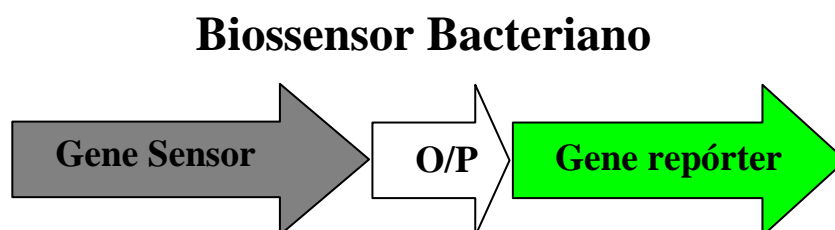


Figura 2 – Esquema da construção de um biossensor bacteriano.

1.4 Genes repórteres

A tecnologia de gene repórter permite a construção de biossensores de manuseio simples. Os genes repórteres codificam a informação para a síntese de uma enzima cuja atividade possa ser facilmente detectada. No biossensor, estes genes são ligados a um promotor ativado pela substância de interesse (Ex.: poluente orgânico, metal pesado, composto de interesse, etc.). A quantidade de enzima produzida é proporcional à concentração da substância na amostra. Os principais genes codificadores de proteínas repórteres atualmente empregados neste tipo de trabalho são: *lacZ*, *lucFF*, *lux* e *GFP* (Magrisso, 2008).

Apesar desta variedade de genes repórteres mencionados, durante a caracterização de novos promotores, há dificuldades para obtenção de uma quantificação rápida, que possa ser feita sob situações adversas, tais como pH extremo e outras condições ambientais. Por este motivo, muitos autores têm utilizado a proteína repórter GFP, que apresenta uma grande versatilidade, conforme será descrito adiante.

Tabela 2 – Componentes biológicos empregados na construção de biossensores baseados em microrganismos geneticamente modificados (continua).

Gene sensor	Metal	Genes Repórteres	Bactéria hospedeira	Faixa de quantificação (mM)	Tempo de incubação	Referência
<i>arsB</i>	As ³⁺	<i>blaZ</i>	<i>S. aureus</i>	1–10	60 min	Ji e Silver (1992)
	As ⁵⁺			10–100		
<i>arsR</i>	Bi	<i>luxAB (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	100–1000	120 min	Cai e Dubow (1997)
	Sb			0,2–1		
	As			0,01–1		
	As	<i>luxFF</i>	<i>E. coli</i>	0,01–1	8 h	Hakkila et al. (2002)
	As	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	0,01–1	30 min	Ramanathan et al. (1998)
	As	<i>lacZ</i>		0,1–100		
	Sb	<i>luxFF</i>	<i>E. coli</i>	0,005–10	90 min	Tauriainen et al. (1999)
	As ³⁺			0,033–1		
	As ⁵⁺			33–33000		
	Cd	<i>luxAB (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	10–10000	60 min	Stocker et al. (2003)
	Sb			0,1–100		
	As	<i>luxAB (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	0,1–0,8	60 min	Trang et al. (2005)
	As	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>E. coli</i>	0,1–0,4	12 h	Roberto et al. (2002)
	As	<i>luxGR (P. plagiophthalmus)</i>	<i>P. fluorescens</i>	0,13–133	120 min	Petanen et al. (2001)
	Cd	<i>luxFF</i>	<i>S. aureus</i>	0,1–10	120 min	Tauriainen et al. (1997)
Sb	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>E. coli</i>	0,5–5	120 min	Liao e Ou (2005)	
As ³⁺			0,1–10			
As ⁵⁺			0,4–25			
<i>arsRD</i>	As ³⁺	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	1–50	17 h	Scott et al. (1997)
	Sb			0,75–8		
<i>cadAC</i>	Cd	<i>blaZ</i>	<i>S. aureus</i>	0,5–100	90 min	Yoon et al. (1991)
<i>cadC (S. aureus)</i>	Cd	<i>luxF</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	0,003–0,1	180 min	Tauriainen et al. (1998)
<i>chrB</i>	Pb	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>E. coli</i>	1–10	120 min	Liao et al. (2006)
	Sb			0,033–3,3		
	Sn			33–1000		
	Zn			1–33		
	Cd			0,0001–500		
	Pb			0,01–10		
	Sb			0,0001–10		
<i>chrB</i>	Cr	<i>lacZ</i>	<i>C. metallidurans</i>	1–33	8 h	Peitzsch et al. (1998)
<i>chrB</i>	Cr ³⁺	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>C. metallidurans</i>	0,001–50	8 h	Peitzsch et al. (1998)
<i>chrAB</i>	Cr ⁶⁺	<i>luxFF</i>	<i>C. metallidurans</i>	5–80	90 min	Corbisier et al. (1999)
	Cr ³⁺			2,5–40	120 min	Ivask et al. (2002)
	Cr ⁶⁺			2–100		
<i>cnrXYH</i>	Co	<i>luxDABE (V. fischeri)</i>	<i>C. metallidurans</i>	0,04–1	16 h	Tibazarwa et al. (2001)
	Ni			9–400		
				0,1–60		

Fonte: Adaptado de Magrisso, 2008.

Tabela 2 – Componentes biológicos empregados na construção de biossensores baseados em microrganismos geneticamente modificados (conclusão).

Gene sensor	Metal	Genes Repórteres	Bactéria hospedeira	Faixa de quantificação (mM)	Tempo de incubação	Referência
<i>copA</i>	Ag	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	0,3–3	80 min	Riether et al. (2001)
	Cu			3–30		
	Ag	<i>lucFF</i>	<i>E. coli</i>	0,003–0,3	120 min	Hakkila et al. (2004)
	Cu			0,3–300		
<i>copBC</i>	Cu	<i>luxAB (V. fischeri)</i>	<i>P. fluorescens</i>	1–100	180 min	Tom-Petersen et al. (2001)
<i>copSRA</i>	Cu	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>C. metallidurans</i>	1–200	90 min	Corbisier et al. (1999)
<i>CUP1</i>	Cu	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>S. cerevisiae</i>	0,5–5000	120 min	Shetty et al. (2002)
<i>isiAB</i>	Fe	<i>luxAB (V. fischeri)</i>	<i>Synechococcus</i> spp	0,001–1	12 h	Boyanapalli et al. (2007)
<i>fliC</i>	Al	<i>LuxAB (Vibrio harveyi)</i>	<i>E. coli</i>	40–400	20 min	Guzzo et al. (1992)
<i>katG</i>	Cd	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	2–35	90 min	Ben-Israel et al. (1998)
<i>merR (Shigella flexneri)</i>	Cd	<i>lucFF</i>	<i>E. coli</i>	1–100	60 min	Virta et al. (1995)
	Hg	<i>lucFF</i>		10 ⁻⁹ –0,01		
	Hg	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>E. coli</i>	0,005–0,5	8 h	Hakkila et al. (2002)
<i>merR</i>	Hg	<i>lucFF</i>		0,005–0,1		
	Hg	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>		0,0001–0,1		
	Cd	<i>lucFF</i>	<i>P. fluorescens</i>	1–10	120 min	Petanen et al. (2001)
	Hg			10 ⁻⁵ –0,1		
	Cd	<i>lucFF</i>	<i>E. coli</i>	0,27–80	120 min	Ivask et al. (2002)
<i>merRB</i>	Hg			0,1–15		
	Zn			1380–4000		
	Hg	<i>lucFF</i>	<i>E. coli</i>	0,0002–0,01	120 min	Ivsak et al. (2001)
<i>merRT</i>	Hg	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	0,005–0,5	40 min	Selifonova et al. (1993)
	Hg	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	2,5 · 10 ⁻⁶ –5 · 10 ⁻⁵	80 min	Golding et al. (2002)
<i>merRTPA (P. stutzeri)</i>	Hg	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	0,00005–0,0005		Pepi et al. (2006)
<i>pbrR</i>	Pb	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>C. metallidurans</i>	500–5000	180 min	Corbisier et al. (1999)
<i>pbrR</i>	Pb	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>E. coli</i>	0,05– 0,4	12 h	Chakraborty et al. (1999)
<i>pvd</i>	Fe	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>P. syringae</i>	0,1–100	16 h	Joyner e Steven (2000)
<i>smtA</i>	Zn	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>Synechococcus</i> spp	0,5–4	240 min	Huckle et al. (1993)
<i>zntA</i>	Cd	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	0,0001–0,1	120 min	Shetty et al. (2003)
	Cd	Red-shifted <i>GFP (A. Victoria)</i>		0,1–10		
	Pb	<i>lacZ</i>		0,0001–0,1		
	Pb	Red-shifted <i>GFP (A. Victoria)</i>		0,1–10		
	Cd	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	0,01–0,33	80 min	Riether et al. (2001)
	Zn			3–30		
	Cr ⁶⁺			30–300		
	Hg			1–30		
	Pb			0,03–1		
	Cd	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	0,2–10	60 min	Biran et al. (2000)
<i>zntR</i>	Cd	<i>lucFF</i>	<i>E. coli</i>	0,05–30	120 min	Ivask et al. (2002)
	Hg			0,01–1		
	Zn			40–15000		

Fonte: Adaptado de Magrisso, 2008.

1.5 A Proteína Verde Fluorescente (GFP)

A proteína verde fluorescente (GFP) é codificada pelo gene *GFP* da água-viva *Aequorea victoria* (Prasher et al., 1992). A GFP é um monômero de 30 KDa, com 238 aminoácidos. A estrutura da GFP é constituída de um cilindro com aproximadamente 24Å de diâmetro e um comprimento de 42Å. Este cilindro é composto por 22 fitas β -pregueadas, dentro das quais o cromóforo está localizado (Figura 3). As α -hélices formam capas no topo e embaixo do cilindro e ainda protegem o cromóforo. A cavidade contendo o cromóforo possui muitos resíduos de cargas além de moléculas de água que auxiliam na manutenção das pontes de hidrogênio da estrutura (Tsien, 1998).

A proteína GFP selvagem absorve a luz azul no comprimento de onda de 395nm e emite luz verde em 510nm, tanto no organismo vivo quanto purificada em solução. A fluorescência da proteína GFP é produzida até a temperatura de 65°C; é estável na presença de compostos desnaturantes, de proteases e na faixa de pH entre 6 a 12 (Ward et al., 1980). O gene *GFP* pode ser expresso em muitos organismos eucariontes ou procariontes (Errampalli et al., 1999). A proteína GFP pode ser utilizada como repórter para visualização da expressão gênica e localização subcelular de proteínas (Welsh e Kay, 1997).

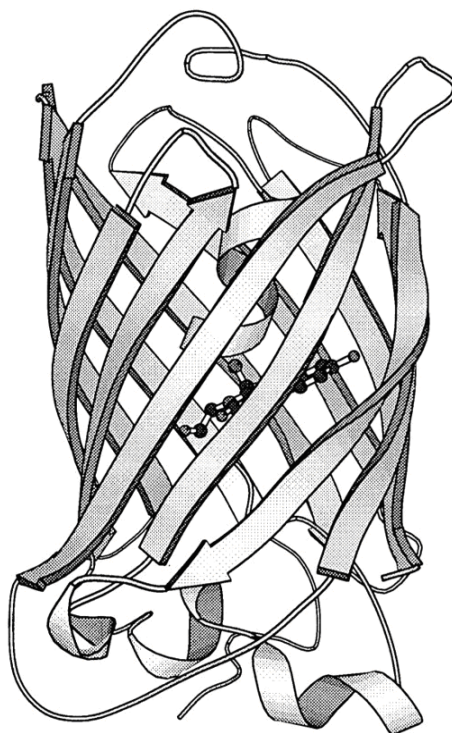


Figura 3 – Representação esquemática da Proteína Verde Fluorescente.
Fonte: Tsien, 1998.

A proteína “enhanced” GFP (EGFP) é uma proteína modificada derivada de GFP, mais estável (Clontech, 1996), com excitação em 488nm e emissão em 508nm de comprimento de onda, que apresenta um aumento de fluorescência da ordem de 35 vezes em relação à selvagem (Li et al., 1997). Exemplo da utilização gene para a monitoramento ambiental foi demonstrado por Wells et al., 2005, onde realizaram a fusão de um promotor bacteriano sensível a arsênio e o gene *EGFP* e testaram sua funcionalidade em *Escherichia coli* DH5 α , mostrando que a bactéria tornou-se um biossensor de arsênio.

Neste trabalho, foi utilizado o plasmídeo pBB-EGFP (Quadros, 2007), que contém algumas características importantes para as estratégias propostas, tais como:

- Plasmídeo amplo-espectro para transformação de bactérias Gram-negativas;
- Gene de resistência ao cloranfenicol, possibilitando a clonagem em *C. metallidurans*;
- Possibilidade de transformação por conjugação;
- Múltiplos sítios de clonagens;
- Gene repórter *EGFP*;
- Sítio de clonagem *NdeI* (CATATG) à montante do gene *EGFP*, permitindo a clonagem das regiões operadoras/promotoras dos genes sensores antes do códon de transcrição ATG.

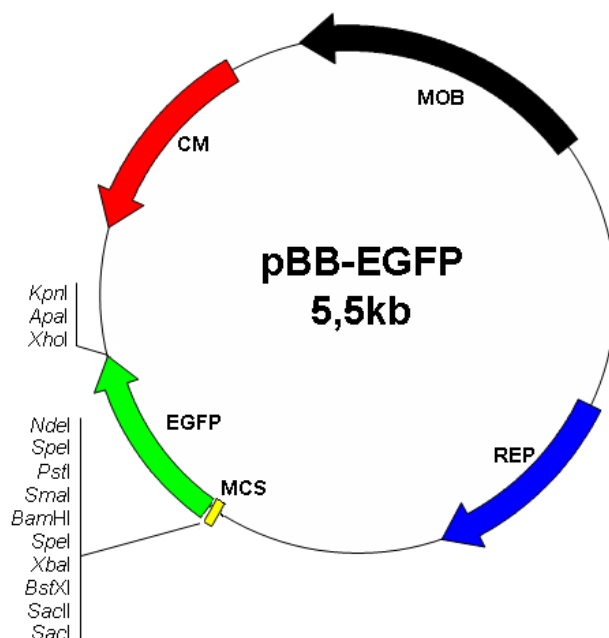


Figura 4 – Esquema do plasmídeo pBB-EGFP.

1.6 Genes biossensores de metais pesados

Alguns trabalhos descrevem o uso de fragmentos aleatórios de DNA e bibliotecas genômicas na construção de biossensores de metais pesados (Dubow, 1998), mas a grande maioria dos relatos mais recentes aponta para uma escolha adequada de um gene sensor conhecido, como por exemplo, regiões regulatórias de operons de resistência bacteriana e/ou mecanismos de captação de metais pesados (Tabela 2). As bactérias têm participação considerável nas transformações iônicas dos metais, promovendo assim aumento de sua mobilidade (biolixiviação) ou sua imobilização (biorremediação). A resistência bacteriana aos íons de metais pesados resulta de mecanismos isolados ou simultâneos: precipitação extracelular, sequestro no envelope celular, precipitação e transformação redox intracelular (Brunis et al., 2000; Rosen et al., 1999). Esses mecanismos são ativos contra os efeitos tóxicos dos íons de metais pesados (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , As^{3+} , As^{5+} , Sb^{2+} , Ag^+ , Tl); tanto quanto os metais essenciais, quando presentes em concentrações perigosamente elevadas para as células (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{-2}) (Bontidean et al., 2000, 2004).

Dentre as bactérias resistentes a metais pesados, destaca-se a *Cupriavidus metallidurans* CH34, anteriormente conhecida como *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans* CH34 e depois como *Wautersia metallidurans* CH34 (Vandamme et al., 2004). *C. metallidurans* é classificada como β -proteobacteria quimiolitotrófica facultativa, possui um cromossomo (3,9 Mb), um megaplasmídeo (2,6 Mb), e dois grandes plasmídeos: pMOL30 (234 kb) e pMOL28 (171 kb) (Monchy et al., 2006). Dentre todas as bactérias conhecidas, esta é a que apresenta os maiores índices de resistência a metais pesados (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , CrO_4^{-2} , Hg^{2+} , Pb^{2+}). Os genes codificadores das proteínas que conferem resistência a estes metais estão contidos nos plasmídeos e também no cromossomo (Diels et al., 2002; Grass et al., 2005; Mergeay et al., 2003; Taghavi et al., 1997).

Por conterem operons específicos de resistência para os metais mercúrio, arsênio e chumbo, neste trabalho, o DNA total de *C. metallidurans* CH34 foi escolhido como molde para obtenção dos fragmentos de DNA correspondentes aos operadores/promotores de: mercúrio (operon *mer*), arsênio (operon *ars*) e chumbo (operon *pbr*) para construções de biossensores bacterianos dos respectivos metais.

1.7 Operon *mer*

A atenção voltada para o estudo dos vários temas ligados a biorremediação de íons mercúrio justifica-se pelo fato deste ser um dos metais pesados mais tóxicos para todos os seres vivos (Tabela 1).

O mercúrio é um metal pesado altamente tóxico para microrganismos, mas apesar disso, ou exatamente por isso, operons de resistência a esse íon são frequentemente encontrados nos genomas microbianos (Nies, 1999; Silver e Phung, 2005). Em bactérias, a resistência aos íons mercúrio é codificada pelo operon *mer* que está presente em várias bactérias Gram-negativas: *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xhantomonas sp.*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas stutzeri*; e também está presente em bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Bacillus sp* (Nascimento et al., 1992; Nascimento e Chartone-Souza, 2003). Os operons *mer* variam na estrutura genética e são constituídos por genes que codificam as proteínas regulatórias (*merR* e *merD*) e estruturais de transporte (*merT*, *merP* e/ou *merC*, *merF*) e redução (*merA*) do íon Hg^{2+} a Hg^0 (Figura 5). Em alguns casos, também está presente o gene *merB*, que codifica uma proteína capaz de hidrolizar a ligação metil-mercúrio C- Hg^{2+} , antes da redução do Hg^{2+} (Nascimento e Chartone-Souza, 2003; Silver et al., 2005).

O operon *mer* de *C. metallidurans* CH34 está presente no cromossomo e nos plasmídeos pMOL28 e pMOL30. No plasmídeo pMOL30 o operon *mer* está inserido no transposon Tn4380, sendo composto pelos genes *merR*, *merT*, *merP*, *merA*, *merD* e *merE* (Mergeay et al., 2003). No plasmídeo pMOL28, o operon *mer* apresenta grande homologia e a mesma disposição dos genes do operon *mer* do plasmídeo pMOL30, sendo também parte do transposon Tn4378 (Champier et al., 2004). No cromossomo, o operon *mer* é composto apenas pelos genes *merR*, *merT*, *merP*, *merA* (Mergeay et al., 2003) (Figura 6).

O principal mecanismo de resistência bacteriano ao mercúrio é a redução de íons Hg^{2+} a mercúrio metálico (Hg^0), que é um elemento volátil, capaz de difundir-se passivamente para o exterior da célula (Silver e Phung, 2005). O gene *merP* codifica uma proteína periplasmática (MerP) que é capaz de se ligar especificamente a íons Hg^{2+} e transportá-los à proteína de membrana MerT, cuja função é transferir o íon Hg^{2+} diretamente à redutase de mercúrio MerA. Íons Hg^{2+} que driblam esse sistema ou entram na célula por sistemas inespecíficos de captura de íons ligam-se à MerR, induzindo a expressão do operon (Figura 5) (Champier et al., 2004; Rossy et al., 2004).

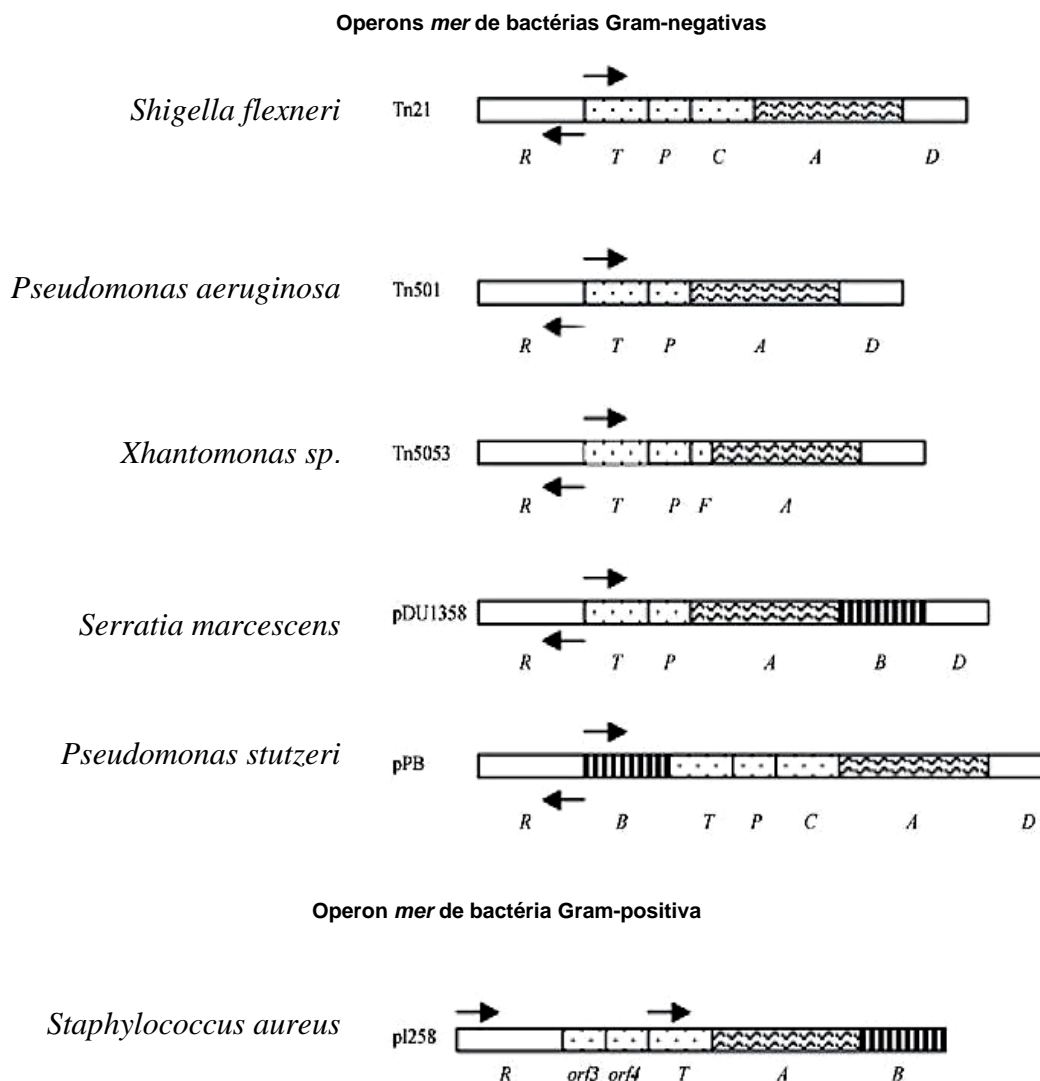


Figura 5 – Representação esquemática de operons *mer* de diferentes bactérias.
 Fonte: Nascimento e Chartone-Souza, 2003.

A regulação da expressão do operon *mer* é realizada pelas proteínas MerR e MerD. MerD não se liga ao DNA, mas interage com o complexo MerR-promotor-operador, sendo um co-regulador da indução do operon. Na falta de íons Hg^{2+} , forma-se um complexo ternário entre MerR, MerD e a região do promotor-operador, reprimindo a expressão dos genes do operon. Na presença de íons Hg^{2+} , MerR liga-se a esse íon que é, então, deslocado da região do promotor-operador pela ação de MerD, o que permite a expressão dos genes do operon (Champier et al., 2004).

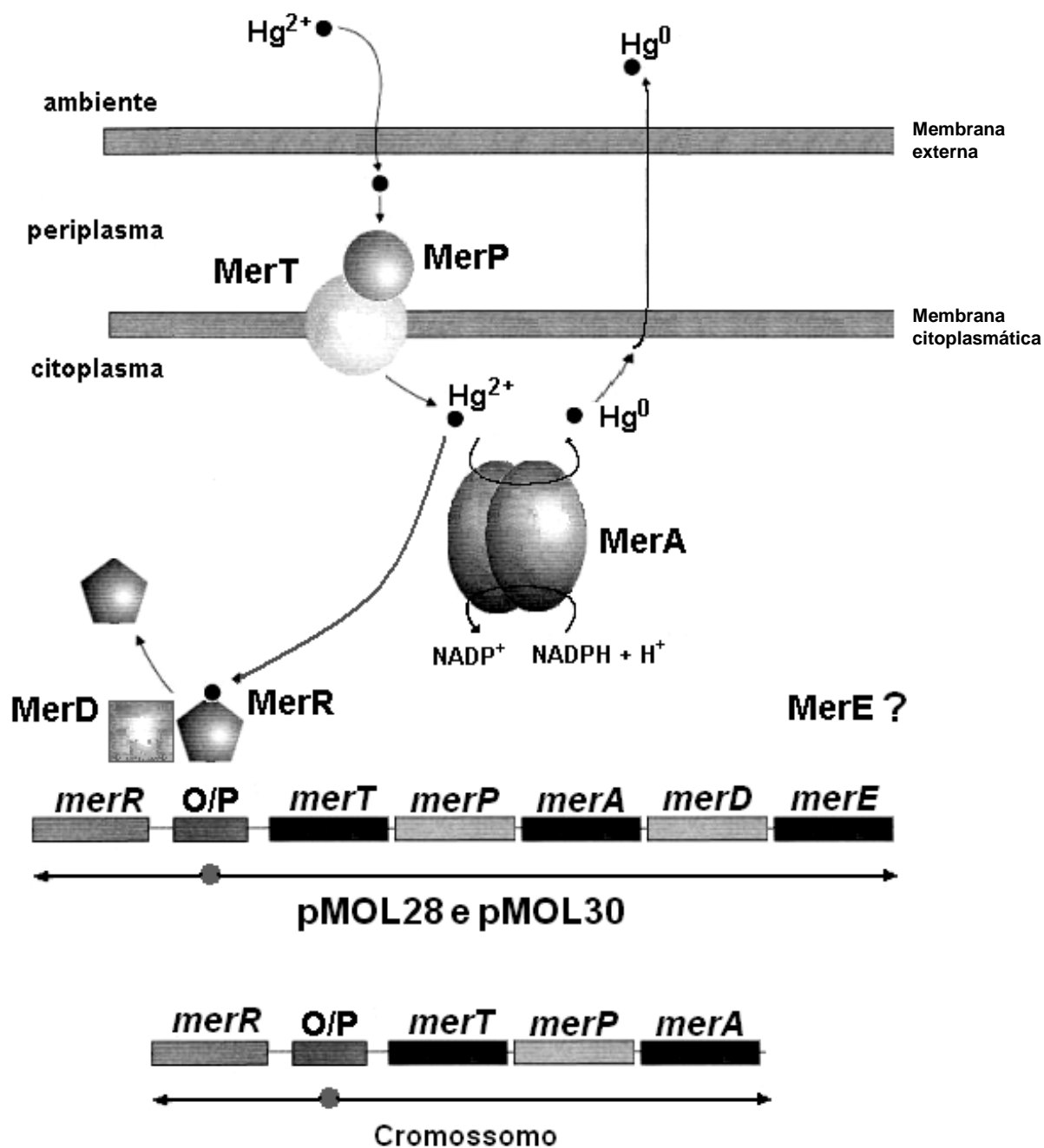


Figura 6 – Representação esquemática do sistema de resistência a Hg^{2+} em *C. metallidurans* CH34. Na parte inferior da figura estão representados os genes do operon *mer* presente nos plasmídeos pMOL28 e pMOL30 e na região cromossomal. As flechas indicam o sentido de transcrição dos genes. Na parte superior da figura estão indicadas as possíveis proteínas codificadas. Íons Hg^{2+} (•) são transportados para o interior da célula pelas proteínas MerP/MerT. MerA reduz íons Hg^{2+} a Hg^0 , utilizando NADPH. O mercúrio metálico (Hg^0) é volátil e difunde-se para o meio exterior da célula. Íons Hg^{2+} livres ligam-se à MerR, provocando alteração da conformação MerR-MerD e consequentemente ativação do operon.
 Fonte: Biondo, 2008.

A falta do gene *merD* no operon *mer* cromossomal não impede a expressão dos genes de resistência desse operon. MerE é uma proteína com função ainda desconhecida (Silver e Phung, 2005).

Na construção da maioria das bactérias biossensoras de mercúrio foi empregado, como sensor de íons Hg^{2+} , um fragmento de DNA contendo o gene *merR* e a região operadora/promotora do operon *merR* (Tabela 2). Todavia, mais recentemente, Omura et al. (2004) desenvolveram um biossensor bacteriano contendo um fragmento de DNA maior, correspondente ao gene *merR*, a região operadora/promotora e o gene *merT*. Estes autores relataram ter conseguido, empregando esta abordagem, obter uma bactéria biossensora muito mais sensível, capaz de detectar níveis picomolares de íons Hg^{2+} .

Para este trabalho, a região do operon *merR*/o/p foi inserida à montante do gene *EGFP* para a construção de um biossensor bacteriano específico de mercúrio.

1.8 Operon *ars*

O arsênio existe na natureza numa variedade de formas químicas, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas. Os altos níveis de toxicidade de arsênio são muito bem conhecidos, pois os seus compostos são facilmente absorvidos por via oral ou inalação. O efeito tóxico das espécies de arsênio depende, principalmente, de sua forma química. Arsênio em águas naturais pode ocorrer como arsenito (As (III) ou As^{3+}) ou arseniato (As (V) ou As^{5+}). Uma longa exposição a compostos inorgânicos de arsênio pode conduzir a várias doenças. Dentre as formas mais tóxicas, o arsênio trivalente (arsenito) é 60 vezes mais tóxico que a forma oxidada pentavalente (arseniato). Os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos que as formas orgânicas metiladas (Barra et al., 2000).

É bem conhecido que muitos microrganismos sobrevivem na presença de compostos de arsênio, induzindo a expressão de proteínas da resistência (Diorio et al., 1995).

Em *E. coli* K12, a presença do operon que confere resistência aos compostos derivados de arsênio, o operon *ars*, foi detectado pela análise do genoma (Sofia et al., 1994). O operon *ars* confere resistência a arseniato, arsenito e antimoniato (Carlin et al., 1995). O operon *ars* desta bactéria é constituído por dois genes reguladores (*arsR* e *arsD*) e três genes estruturais (*arsA*, *arsB*, e *arsC*) (Figura 7A). A proteína ArsR funciona como repressor do operon *ars*, ligando-se à região o/p, impedindo a transcrição dos genes à jusante. Foi demonstrado que ArsR detecta As^{3+} com elevada afinidade (Xu et al., 1996). Na presença de

arsênio, ArsR sofre uma mudança conformacional e se libera da região o/p do operon, permitindo a transcrição dos genes estruturais *arsDABC* (Yagi, 2007).

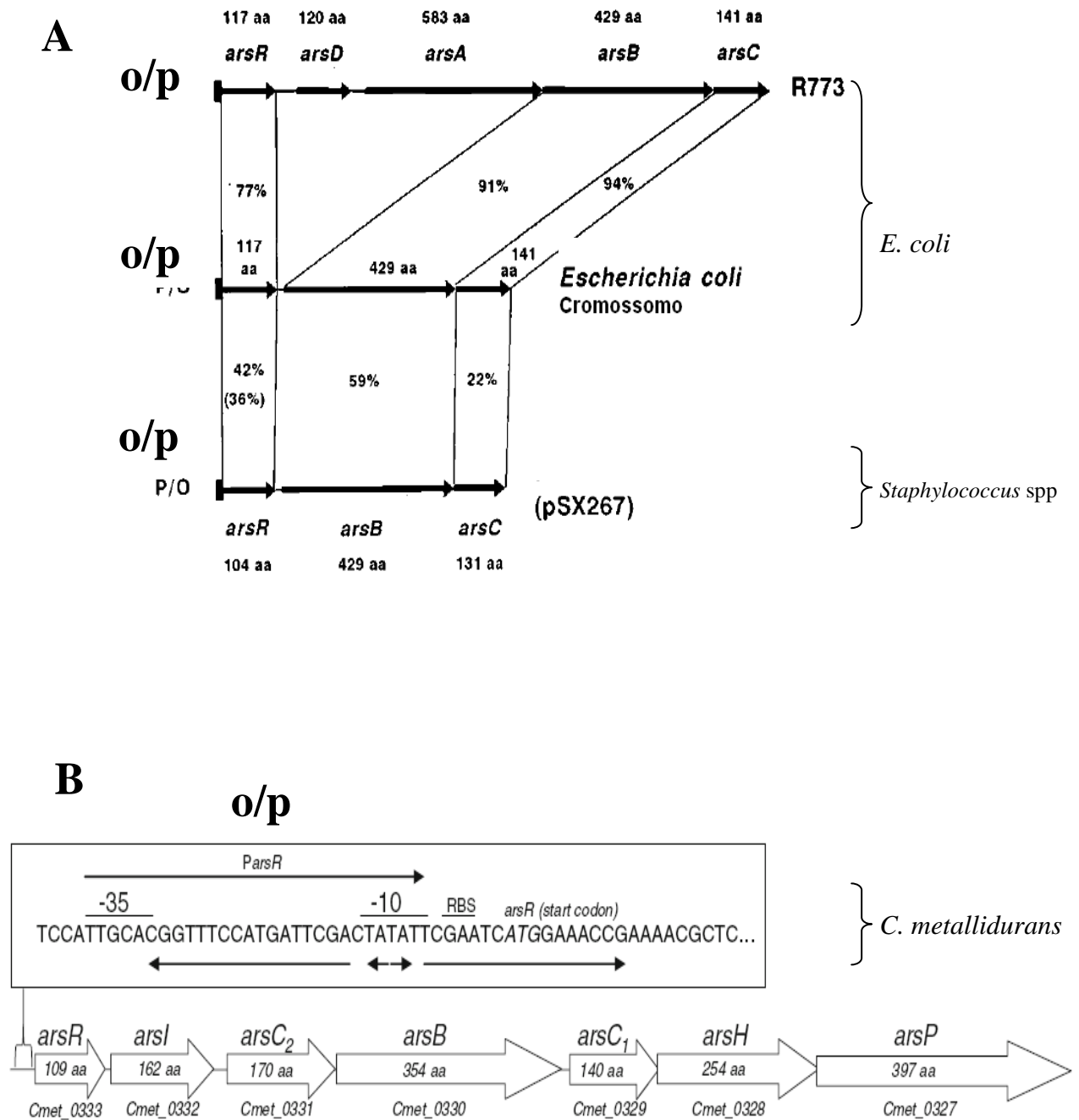


Figura 7 – Esquema da organização do operons *ars* de: A) *E. coli*: plasmídeo R773 e cromossômico de *E. coli* K12 e do plasmídeo pI258 de *Staphylococcus* spp.; B) Operon *ars* do cromossomo 1 de *C. metallidurans* CH34.

Fontes: A) Diorio et al., 1995; B) Zhang et al., 2009.

O mecanismo de detoxificação de arseniato/arsenito de *E. coli* envolve a proteína arseniato redutase (ArsC), que converte arseniato As^{5+} em arsenito As^{3+} (mais tóxico), que é, então, bombeado para fora da célula por uma permease de arsenito (ArsB).

Recentemente, verificou-se que no genoma de *C. metallidurans* CH34 também há um operon de resistência a arsenito/arseniato (Zhang et al., 2009). De fato, o cromossomo 1 de *C. metallidurans* CH34 contém sete genes envolvidos na resistência a arsenito/arseniato: *arsR-arsI-arsC2-arsB,-arsC1-arsH-arsP* (Figura 7B). Neste trabalho, a região do operon *o/p/arsR* foi inserida à montante do gene *EGFP* para a construção de um biossensor bacteriano específico de arsênio.

1.9 Operon *pbr*

Os autores Borremans et al. (2001) descreveram o primeiro mecanismo específico de resistência aos íons Pb^{2+} em bactérias. Esse mecanismo, descoberto em *C. metallidurans* CH34, é codificado pelo operon *pbr* e combina as funções envolvidas na captura, efluxo e acúmulo de íons Pb^{2+} (Figura 8A).

O operon *pbr* contém os seguintes genes estruturais: *pbrT*, que codifica uma proteína de captura de íons Pb^{2+} ; *pbrA*, que codifica ATPase do efluxo de Pb^{2+} ; *pbrB*, que codifica uma proteína integrante da membrana de função desconhecida; e *pbrC*, que codifica uma proteína peptidase sinal. A jusante do *pbrC*, o gene do *pbrD*, foi identificado como uma região do DNA que seria essencial para a funcionalidade do seqüestro de íons Pb^{2+} . A transcrição do *pbrABCD* é dependente da indução da região promotora por íons Pb^{2+} . A regulação do operon é feita pelo gene *pbrR*, que pertence à família de proteínas regulatórias MerR sensíveis a íons (Borremans et al., 2001). A Figura 8B ilustra um esquema do operon *pbr* e parte da seqüência de DNA.

Outros mecanismos de resistência ao chumbo foram descritos, todavia, não específicos, tais como o operon *cad* ($Cd^{2+}/Pb^{2+}/Sb^{3+}$), encontrado no plasmídeo pI258 de *S. aureus* (Liao et al., 2006), e o gene *zntA* ($Cd^{2+}/Zn^{2+}/Pb^{2+}$) de *E. coli* (Shetty et al., 2003).

Para o trabalho aqui proposto foi empregada a inserção da região do operon *pbrR/o/p* à montante do gene *EGFP* para a construção de um biossensor bacteriano específico de chumbo.

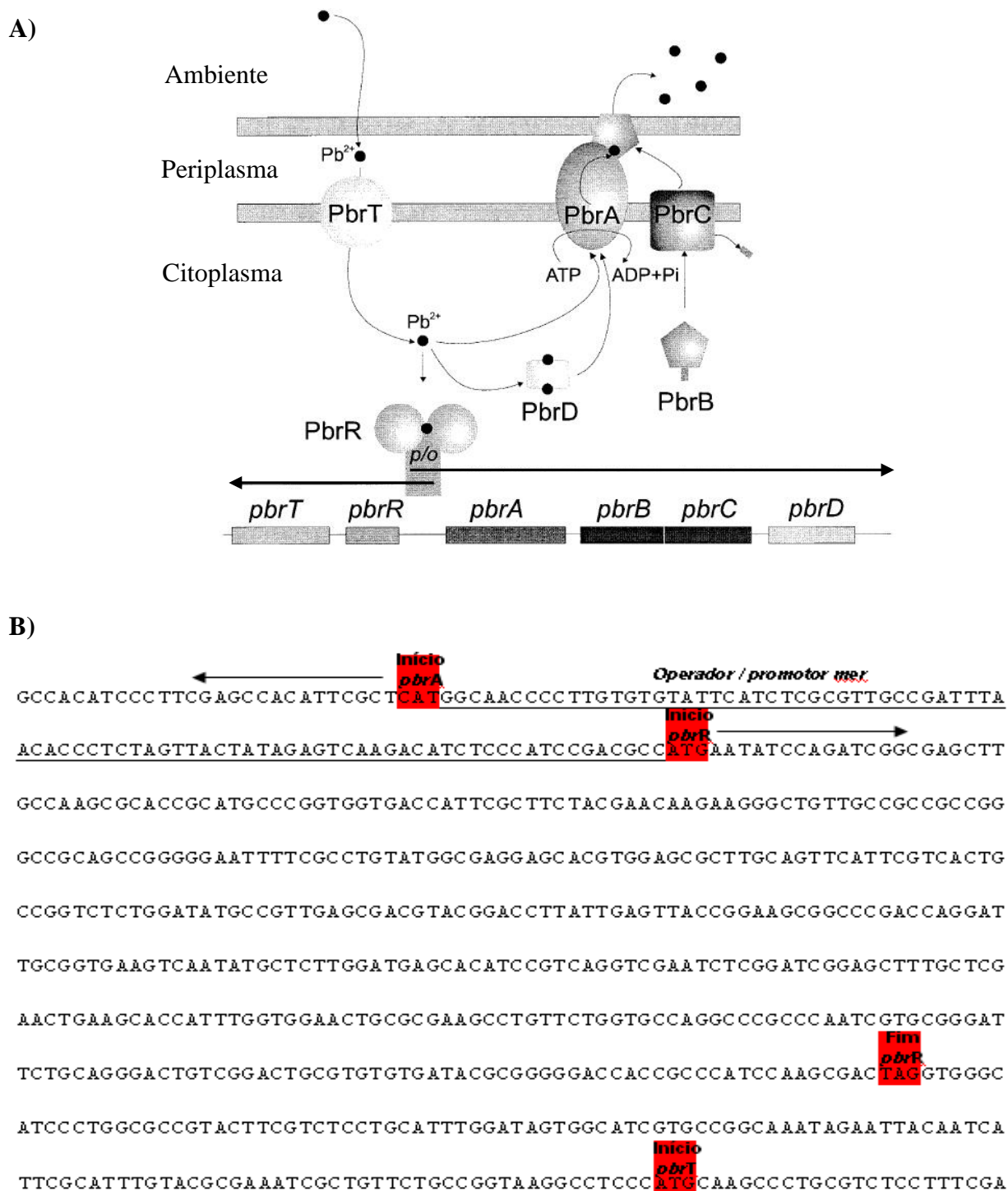


Figura 8 – A) Modelo do operon *pbr* de *C. metallidurans* CH34 que codifica resistência aos íons Pb^{2+} . Estão indicados os genes: *pbrT* (captura de Pb^{2+}), *pbrR* (regulador do operon), *pbrA* (ATPase do efluxo de Pb^{2+}), *pbrB* (função ainda desconhecida), *pbrC* (peptidase sinal), *pbrD* (seqüestro de Pb^{2+}). B) Parte da seqüência do operon *pbr* do plasmídeo pMOL30 de *C. metallidurans* CH34, destacando o início e o fim do gene *pbrR* e a região operadora/promotora.

Fontes: A) Borremans et al., 2001; B) National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram construir, através de técnicas de engenharia genética, três biossensores bacterianos, cada um deles especificamente capaz de detectar e quantificar os metais pesados mercúrio, arsênio e chumbo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

As linhagens bacterianas que foram utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 3. Os oligonucleotídeos iniciadores, empregados na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”), para amplificação dos fragmentos de DNA de interesse foram sintetizados pela empresa “Bionner Oligo Synthesis Report” e estão descritos na Tabela 4. Os plasmídeos utilizados para a obtenção das cepas recombinantes e suas características principais encontram-se apresentados na Tabela 5.

As diversas técnicas de manipulação microbiana, tais como: preparo de meios de cultura e condições de crescimento; reagentes e soluções; extração e purificação de DNA total e plasmidial, análise do DNA em gel de agarose; preparo de células bacterianas competentes; transformação de bactérias por eletroporação; foram realizadas conforme Sambrook e Russell (2001).

Tabela 3 – Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho

Linhagem	Características genéticas	Utilização	Origem
<i>C. metallidurans</i> CH34	β -proteobacteria quimiolitotrófica facultativa. Possui um cromossomo (3,9 Mb), um megaplasmídeo (2,6 Mb) e dois grandes plasmídeos: pMOL30 (234 kb) e pMOL28 (171 kb). Múltipla resistência a metais.	Fonte dos operons <i>mer</i> , <i>ars</i> e <i>pbr</i>	DSMZ (n° 2839)
<i>E. coli</i> DH5 α	γ -proteobacteria heterotrófica. F'/endA1 <i>hsdR17</i> (r κ ⁻ m κ ⁺) <i>supE44</i> thi ⁻¹ <i>recA1</i> <i>gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacI</i> ZYA- <i>argF</i>)U169 <i>deoR</i> (Φ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)	Inserção dos plasmídeos	Coleção do Laboratório

Tabela 4 – Sequência dos oligonucleotídeos empregados para amplificação por PCR.

Nome	Sequência	Sítio de restrição	Origem
merR-primerF:	5' <u>GGATCC</u> CTAAGGCATAGCCG 3'	<i>Bam</i> HI	este trabalho
merR-primerR:	5' GAC <u>CATATG</u> CCTTGTCTTTCGAATTG 3'	<i>Nde</i> I	este trabalho
arsR-primerF:	5' <u>CTGCAGG</u> TTGAGGCCGAATT 3'	<i>Pst</i> I	este trabalho
arsR-primerR:	5' <u>CATATG</u> TCAGGACTCCGTAGC 3'	<i>Nde</i> I	este trabalho
pbrR-PrimerF:	5' <u>GGATCC</u> CTAGTCGCTTGGATG 3'	<i>Bam</i> HI	este trabalho
pbrR-primerR:	5' CTC <u>CATATG</u> AACCCCTTGTGTGTATTC 3'	<i>Nde</i> I	este trabalho

Tabela 5 – Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Resistência	Origem
pTZ57R/T	Ampicilina	Fermentas
pTZ-Mer	Ampicilina	este trabalho
pTZ-Ars	Ampicilina	este trabalho
pTZ-Pbr	Ampicilina	este trabalho
pBB-EGFP	Cloranfenicol	Quadros, 2007
pGHg	Cloranfenicol	este trabalho
pGAs	Cloranfenicol	este trabalho
pGPb	Cloranfenicol	este trabalho

3.2 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados no preparo das soluções foram de grau de pureza analítica e a água usada foi bidestilada.

As soluções foram esterilizadas a 120 °C, durante 20 minutos ou quando necessário, foram filtradas em membrana do tipo "millipore" de poro de 0,22 µm.

- a) Solução I: Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, Glicose 50 mM, pH 8,0
- b) Solução II: NaOH 0,2 M, SDS 1%.
- c) Solução III: Acetato de Sódio 3 M, Ácido Acético 2 M, pH 4,8.
- d) Solução de RNase A: 10 mg/mL em NaOH 0,1 M.
- e) Solução de lise: Tris 40 mM, SDS 1%, pH final 12,6 com NaOH 5 M.
- f) Solução estoque de Brometo de Etídeo: 100 µg/mL de água destilada.
- g) TE: Tris-HCl 20mM, EDTA 20 mM, pH final 8,0.
- h) TBE 10X: Tris 0,89 mM, Ácido Bórico 0,89 mM, EDTA 0,2 mM.
- i) Tampão E: Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7,9.
- j) Tampão de Amostra (10X) – “Stop Mix”: glicerol 50%, azul de bromofenol 0,5%, EDTA 100 mM, pH 8,0.
- k) Solução Salina-EDTA: NaCl 150 mM, EDTA 100 mM.
- l) Fenol/clorofórmio 1:1.
- m) Clorofórmio/álcool isoamílico 24:1.
- n) Acetato de Amônio 4 M.
- o) Etanol 70%.
- p) NaCl 5 M.
- q) SDS 20%.
- r) XGal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-Galactopiranosídeo) 50 mg/mL de N,N'-dimetilformamida.
- s) IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) 0,1 M.
- t) Fenol Tamponado.
- u) Etanol.
- v) Isopropanol.

3.3 Meios de Cultura e Condições de Crescimento Bacteriano

Os componentes dos meios de culturas bacterianos, após o preparo, foram esterilizados em autoclave a 120 °C, por 20 minutos. Os meios sólidos empregados no cultivo foram idênticos aos meios líquidos, acrescidos de 2% de Ágar Bacteriológico. As colônias de *E. coli* DH5 α e dos clones recombinantes derivados, quando semeados em meio sólido, contidos em placas de Petri, foram incubados em estufa, a 37 °C, enquanto as colônias de *C. metallidurans* CH34 foram incubadas em estufa, a 28 °C. O crescimento em meio líquido foi feito com aeração em agitador nas mesmas temperaturas citadas.

- a) LB - Luria Bertani (Meio Completo para Bactérias): 1% Triptona, 1% Cloreto de Sódio, 0,5% Extrato de Levedura.
- b) Caldo Nutriente (Meio Completo para Bactérias): Extrato de carne 0,3%, Peptona 0,5%.
- c) SOC (Meio de Recuperação para Bactérias): 2% Triptona, 0,5% Extrato de Levedura, 10 mM de Cloreto de Magnésio, 10 mM Sulfato de Magnésio, 20 mM Glicose.
- d) MJS (Meio Mínimo): HEPES 12,5 mM (pH 7,1), NaCl 50 mM, NH₄Cl 20 mM, KCl 1 mM, Casamino Ácido 0,8%, Glicerol 0,4%, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM, MnCl₂ 0,05 mM, Tiamina 0,005%.

3.4 Agentes Antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos foram adicionados ao meio de cultura quando necessário, nas seguintes concentrações finais:

- a) Ampicilina: 100 μ g/mL
- a) Carbenecilina: 60 μ g/mL.
- b) Cloranfenicol: 25 μ g/mL para *E. coli* e 230 μ g/mL para *C. metallidurans*

3.5 Enzimas

As enzimas de restrição e outras enzimas utilizadas na manipulação de DNA seguiram seus respectivos protocolos e tampões, de acordo com cada fabricante.

3.6 Extração e purificação de DNA plasmidial de *E.coli*:

3.6.1 Minipreparação de DNA plasmidial – “MiniPrep”

Os clones de bacterianos foram inoculados em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado, na concentração apropriada. O inóculo foi incubado (37 °C) por aproximadamente 16 horas, com aeração em agitador.

Uma alíquota de 3 mL foi centrifugada, em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, a 12000 g por 2 minutos, sendo o sobrenadante descartado.

O sedimento foi ressuspensão em 300 µL de Solução I, com uma micropipeta. Em seguida, foram adicionados 300 µL da Solução II, mantendo-a em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período foram adicionados 300 µL da Solução III, sendo então incubada durante 10 minutos no gelo. Após esse tempo os tubos foram centrifugados a 12000 g, por 15 minutos, à 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e a este foram acrescentados 1% de Solução de RNase A, realizando-se uma incubação em banho-maria (37 °C), por 30 minutos. Logo em seguida, adicionou-se 600 µL de solução clorofórmio/álcool isoamílico; a mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 12000 g, por 2 minutos, em temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada e a esta, acrescentada 750 µL de isopropanol. A solução foi misturada por inversão e incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente.

Após esse tempo a solução foi centrifugada a 12000 g, por 15 minutos, à 4 °C, o sedimento foi lavado com etanol 70% (4 °C) e seco a vácuo durante 20 minutos. O resíduo seco foi ressuspensão em 50 µL de água destilada. Uma alíquota deste material foi, então, submetida à eletroforese em gel de agarose.

3.6.2 Maxipreparação de DNA plasmidial – “Maxi Prep”

Uma cultura bacteriana de 5 mL pré-crescida foi inoculada em 300 mL de meio líquido contendo o antibiótico apropriado, na concentração apropriada. O inóculo foi incubado (37 °C) por aproximadamente 16 horas, com aeração em agitador.

A cultura foi centrifugada a 6000 g, por 10 minutos, à 4 °C, sendo o sobrenadante descartado.

O sedimento foi ressuspenso em 4 mL de Solução I, com uma pipeta. Em seguida, foram adicionados 8 mL da Solução II. Após homogeneização, incubou-se por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 6 mL da Solução III, com incubação durante 15 minutos no gelo. Após estes passos, a suspensão foi centrifugada a 12000 g, por 15 minutos, à 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e a este acrescentado 1 volume de isopropanol. Foi realizada a incubação em temperatura ambiente, por 10 minutos, seguida de centrifugação a 12000 g, por 15 minutos, à 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 2 mL de TE. Foram feitas alíquotas de 1 mL para cada microtubo. Logo em seguida, adicionou-se 500 µL fenol tamponado, homogeneizando manualmente, por 3 minutos. Centrifugou-se a 12000 g, por 15 minutos, à 4 °C. A fase aquosa (superior) foi transferida para outro microtubo e foram adicionados 500 µL de solução clorofórmio/álcool isoamílico. A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 12000 g, por 5 minutos, à 4 °C. A fase aquosa (superior) foi então recuperada e repetida à última etapa da extração, com o clorofórmio/álcool isoamílico. Foram feitas alíquotas de 500 µL com a fase aquosa recuperada, que foram acondicionadas em diferentes microtubos. Para a precipitação do DNA plasmidial, foram acrescentados 50 µL de acetato de amônio 4 M e 1 mL de etanol e incubação (4 °C), por 1 hora. Após esse tempo, a solução foi centrifugada a 12000 g, por 15 minutos, à 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 70% (4 °C) e seco a vácuo, durante 20 minutos. O resíduo seco foi ressuspenso em 100 µL de água destilada. Adicionou-se 1 µL de RNase A e incubou-se por 30 minutos (37 °C). Em seguida, repetiu-se a etapa de precipitação do DNA plasmidial. Uma alíquota deste material foi então submetida à eletroforese em gel de agarose.

3.7 Isolamento e manipulação de megaplasmídeo

Foi realizado o cultivo de *C. metallidurans* CH34 de 15 mL em Caldo Nutriente, que foi incubada (28 °C) por 16 horas com aeração em agitador. A cultura foi centrifugada a 12000 g, por 15 minutos, à 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL do Tampão E, acrescido de 2 mL da solução de lise recentemente preparada. A mistura foi incubada em temperatura ambiente, por 20 minutos, sob agitação suave. Incubou-se, subsequentemente, à 68 °C, por 75 minutos. A esta suspensão, adicionou-se 0,5 mL de NaCl 4 M e 8 mL de fenol-clorofórmio (1:1, saturado em H₂O, pH 4,8) e misturou-se, delicadamente, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12000 g, por 30 minutos,

à 4 °C e armazenado por 2 horas, à 4 °C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, onde foram adicionados com 2 mL de éter dietílico. Novamente, a preparação foi centrifugada em rotação de 12000 g, por 5 minutos, à 4 °C. Descartou-se a fase superior e o éter dietílico residual foi evaporado por aproximadamente 20 minutos, à 37 °C. Foram feitas alíquotas de 750 µL da solução de DNA e, em cada uma delas, acrescentado 750 µL de isopropanol. A preparação foi misturada por inversão e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo de incubação a solução foi centrifugada a 12000 g, por 15 minutos, à 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 70% (4 °C) e seco a vácuo durante 20 minutos. O resíduo seco foi ressuspenso em 100 µL de água destilada.

3.8 Análise do DNA em gel de agarose

As análises dos DNAs em géis de agarose foram feitas quando se desejavam visualizar os plasmídeos digeridos com enzimas de restrição e em experimentos de purificação de fragmentos de DNA. O gel de agarose 0,8% foi preparado com tampão TBE na concentração final de 0,5X, e 0,5 µg/mL de brometo de etídeo.

As amostras dos DNAs, misturadas a 20% de solução de tampão de amostra, foram aplicadas em gel e, em seguida, a eletroforese foi realizada em tampão de corrida TBE 0,5X, conforme descrito em Sambrook et al., (2001). Para a visualização do DNA foi utilizado o transluminador com luz ultravioleta de 254 nm. Para a fotodocumentação dos géis, foi utilizado o aparelho "Eagle-eye" da "Stratagene".

3.9 Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose

Para este procedimento foi utilizado o "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega).

Após a eletroforese em gel de agarose, a banda correspondente ao fragmento de DNA de interesse foi cortada do gel e transferida para um microtubo. Adicionou-se 1 volume de tampão de ligação. O gel foi fundido em banho-maria (65 °C). Após a fusão, o material foi transferido para minicoluna, encaixada a um microtubo de 2 mL. O conjunto foi incubado por 1 minuto, em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugado a 12000 g. O líquido do tubo foi descartado. Foram adicionados 700 µL da solução de lavagem. Novamente o material foi incubado, por 1 minuto, em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugado a 12000 g. O

líquido do tubo foi descartado. Repetiu-se o procedimento de lavagem com 500 μ L da mesma solução. Seguiu-se uma centrifugação de 5 minutos, a 12000 g em temperatura ambiente. O microtubo de 2 mL foi descartado e a minicoluna foi inserida em um novo microtubo de 1,5 mL. Acrescentou-se 50 μ L de água estéril à minicoluna, incubou-se por 5 minutos e novamente centrifugou-se a 12000 g, por 2 minutos, em temperatura ambiente. Descartou-se a minicoluna. O microtubo contendo o DNA purificado foi estocado à -20 °C.

3.10 Ligação de fragmentos de DNA

As concentrações de DNA (vetor:inserir) utilizadas nos sistemas de ligação variaram de acordo com o experimento a ser executado. Normalmente, a quantidade de inserção foi de duas a três vezes a superior de vetor, considerando-se o número de moléculas.

O seguinte sistema de ligação foi montado: 5 μ L das soluções contendo DNAs a serem ligados (vetor + inserção), 1/10 do volume final de tampão de ligase 10X, 0,5 μ L da enzima DNA ligase do Fago T4 e água bidestilada estéril para completar o volume desejado. Tipicamente, o volume final foi de 15 μ L, podendo variar de 15 a 20 μ L. Os sistemas foram incubados à 16 °C, por 16 - 24 horas.

3.11 Preparo de células bacterianas competentes

Uma cultura de 5 mL de *E. coli* DH5 α pré-crescida foi inoculada em 500 mL de meio líquido LB e incubada (37 °C), com agitação, até ter atingido uma absorbância de em torno de 0,5 (sob um densidade ótica de 600 nm). A suspensão foi então coletada em tubos de centrífuga de 500 mL, deixada em repouso no gelo por cerca de 30 minutos e centrifugada a 6000 g, por 15 min, à 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspensão em 500 mL de água destilada estéril gelada. As células foram novamente centrifugadas, como no item anterior. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 250 mL de água gelada destilada estéril e centrifugada novamente. As células foram ressuspensas em 50 mL de uma solução de glicerol 10%, à 4 °C, e centrifugadas pela última vez. As células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10%, à 4 °C. Foram feitas alíquotas de 40 μ L da suspensão de células em microtubos e armazenadas à temperatura de -70 °C.

3.12 Transformação de bactérias por eletroporação

As células competentes foram retiradas do freezer -70 °C e colocadas imediatamente no gelo. Foram acrescentados cerca de 1-2 µL de DNA plasmidial. O aparelho eletroporador Gene Pulser (Bio-Rad) foi calibrado para aplicação de pulso de 2,5 V, resistência de 200 Ω e capacitância de 25 µFD. A mistura célula/DNA foi transferida para a cubeta gelada. Em seguida o pulso foi aplicado. As cubetas foram imediatamente removidas da câmara de aplicação do pulso e foi adicionado 1 mL do meio SOC às células. A suspensão foi então transferida para um tubo de ensaio e incubada (37 °C, com agitação, por 1 hora). Após esse tempo de incubação a suspensão foi semeada em placa contendo meio LB sólido, acrescido de antibiótico apropriado e incubada em estufa (37 °C, por 16 horas).

Quando o plasmídeo empregado era do tipo “bluescript”, após a transformação, as células foram semeadas em meio LB sólido, acrescidos de XGal, IPTG e antibiótico apropriado e incubadas (37 °C, por 16 horas). Foi realizada a contagem do número de transformantes contendo o inserto (colônias brancas) e do número total de colônias (brancas e azuis).

3.13 Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

Os fragmentos *merR/o/p*, *o/p/arsR* e *pbrR/o/p* foram amplificados do DNA total de *C. metallidurans* CH34 pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Estes fragmentos foram obtidos utilizando um Termociclador MJ Research PTC-200.

Misturas contendo 50 ng de DNA genômico foram empregadas (DNA molde), 40 µM de dNTPs, 10 pM de cada iniciador, 3,5 mM de MgCl, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase num volume final de 50 µL.

As condições de amplificação foram: a) aquecimento à temperatura de 94 °C, por 2 minutos; b) desnaturação do DNA, à 94 °C, por 1:30 minutos; c) anelamento dos iniciadores, à 60 °C, por 2 minutos; d) extensão do DNA, à 72 °C, por 1:30 minutos; e) repetição de 30 ciclos (das etapas b, c, d); f) extensão final do DNA, à 72 °C, por 10 minutos, para amplificação completa dos produtos. Estes fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. Os produtos amplificados pela PCR, foram posteriormente clonados no vetor pTZ57R/T.

3.14 Avaliação biológica das bactérias recombinantes com os metais pesados

As bactérias recombinantes *C. metallidurans* CH34 / pGHg, *E. coli* DH5 α / pGHg, *C. metallidurans* CH34 / pGAs, *E. coli* DH5 α / pGAs, *C. metallidurans* CH34 / pGPb e *E. coli* DH5 α / pGPb foram pré-inoculadas em Caldo Nutriente, contendo cloranfenicol, e cultivadas sob agitação, por 16 horas, à 37 °C e 28 °C. A partir deste ponto foram preparadas diluições de acordo com as descrições a seguir:

3.14.1 Mercúrio

- *C. metallidurans* CH34 / pGHg:
 - 20 tubos de ensaios contendo: Água bidestilada, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume. Cada tubo de ensaio HgCl₂, partindo do 1º tubo com a concentração de 80 μ M e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.
 - 20 tubos de ensaios contendo: Caldo Nutriente, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume e cloranfenicol. A diluição do HgCl₂ partiu do 1º tubo com a concentração de 80 μ M e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.
- *E. coli* DH5 α / pGHg:
 - 20 tubos de ensaios contendo: Água bidestilada, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume. Cada tubo de ensaio HgCl₂, partindo do 1º tubo com a concentração de 625 nM e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.
 - 20 tubos de ensaios contendo: Caldo Nutriente, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume e cloranfenicol. A diluição do HgCl₂ partiu do 1º tubo com a concentração de 20 μ M e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.

3.14.2 Arsênio

- *C. metallidurans* CH34 / pGAs:
 - 20 tubos de ensaios contendo: Água bidestilada, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume. A diluição do Na₂HAsO₄.7H₂O partiu do 1º tubo com a concentração de 400 mM e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.

- 20 tubos de ensaios contendo: Caldo Nutriente, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume e cloranfenicol. A diluição do $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ partiu do 1º tubo com a concentração de 400 mM e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.
- *E. coli* DH5 α / pGAs:
 - 20 tubos de ensaios contendo: Água bidestilada, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume. A diluição do $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ partiu do 1º tubo com a concentração de 50 mM e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.
 - 20 tubos de ensaios contendo: Caldo Nutriente, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume e cloranfenicol. A diluição do $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ partiu do 1º tubo com a concentração de 50 mM e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.

3.14.3 Chumbo

- *C. metallidurans* CH34 / pGPb:
 - 20 tubos de ensaios contendo: Água bidestilada, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume. A diluição do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ partiu do 1º tubo com a concentração de 5000 μM e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.
 - 20 tubos de ensaios contendo: Caldo Nutriente, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume e cloranfenicol. A diluição do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ partiu do 1º tubo com a concentração de 5000 μM e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.
- *E. coli* DH5 α / pGPb:
 - 20 tubos de ensaios contendo: Água bidestilada, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume. A diluição do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ partiu do 1º tubo com a concentração de 625 μM e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.
 - 20 tubos de ensaios contendo: Caldo Nutriente, inóculo da cultura na diluição 1/100 do volume e cloranfenicol. A diluição do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ partiu do 1º tubo com a concentração de 625 μM e os tubos seguintes com diluições 1/2 do volume, sendo zero a concentração do 20º tubo.

Todos os ensaios de avaliação biológica das bactérias recombinantes com os metais pesados foram feitos em triplicata.

3.15 Microscopia de Fluorescência

As células bacterianas foram observadas num microscópio Leica DMLB, equipado com filtro triplo (B/G/R, nº. 513836), com aumentos de 100X e 1000X. A fonte de excitação foi uma lâmpada de vapor de mercúrio. O microscópio estava acoplado a uma câmera CCD Hitachi KP-D581, para a foto-documentação das células.

3.16 Citometria de Fluxo

Para quantificar os níveis de fluorescência dos clones bacterianos recombinantes obtidos na presença de mercúrio, arsênio e chumbo foi utilizado o citômetro de fluxo Millipore - Guava® EasyCyte™ Mini. Os seguintes parâmetros foram utilizados:

- FSC Gain: X32
- FSC Fine Gain: 168%
- SSC: 889 V
- GRN: 937 V
- YLW: 442 V
- RED: 470 V
- Flow Rate: Medium - 0,59 µL/s
- Refresh Rate: 1000 events
- Events Acquired: 5000
- Dilution Factor: 1
- Original volume: 10 mL

Para atingir os objetivos propostos, foram necessários a obtenção dos fragmentos de DNAs correspondentes das regiões reguladoras-operadoras-promotoras (ROP) dos operons *mer*, *ars*, e *pbr*. Para a obtenção dos plasmídeos biossensores os fragmentos ROP e foram inseridos a montante do gene *EGFP* do plasmídeo pBB-EGFP. As etapas estão detalhadas a seguir.

4.1 Biossensor de Mercúrio.

4.1.1 Construção do plasmídeo pGHg – Biossensor de Hg²⁺

As etapas da construção do plasmídeo biossensor de Hg²⁺ estão esquematizadas nas figuras 9 e 10.

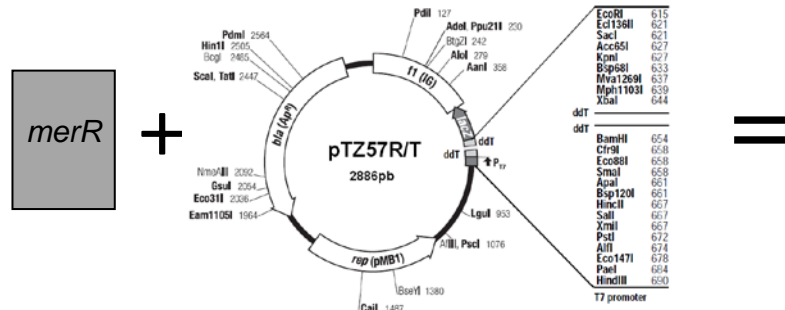
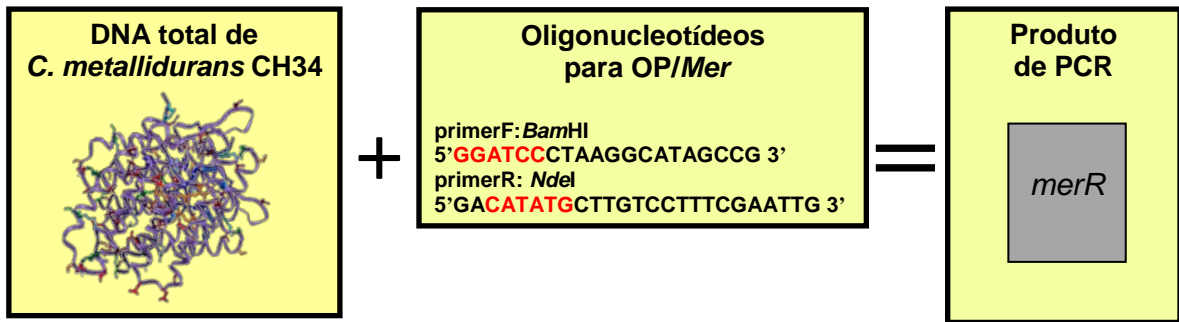
O fragmento de DNA correspondente ao gene *merR/OP* foi amplificado por PCR, empregando o DNA total de *C. metallidurans* CH34, como molde e os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) *merR-primerF* (com o sítio da enzima *Bam*HI): e *merR-primerR* (com o sítio *Nde*I) (Tabela 4).

O fragmento de DNA obtido foi ligado ao vetor pTZ57R/T, dando origem ao vetor pTZ-Mer (Figura 9A). A mistura de ligação foi empregada na transformação genética, por eletroporação, de células *E. coli* DH5 α .

Algumas colônias bacterianas, resistentes à ampicilina e escolhidas ao acaso, tiveram seus DNAs plasmidiais isolados, purificados e digeridos com *Nde*I. Os plasmídeos extraídos de dois clones recombinantes que se encaixavam aos perfis desejados foram selecionados para análises mais detalhadas. Estes plasmídeos recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I, *Bam*HI e analisados em gel de agarose submetido a eletroforese, confirmando-se a construção do plasmídeo desejado pTZ-Mer (Figura 9B).

Os plasmídeos pBB-EGFP e pTZ-Mer foram, primeiramente, digeridos com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI e previamente purificados. Em seguida foi realizada um mistura de ligação, utilizando a enzima T4 DNA ligase, do fragmento Mer obtido (Figura 10A) e vetor pBB-EGFP digerido (Figura 10B).

A)



B)

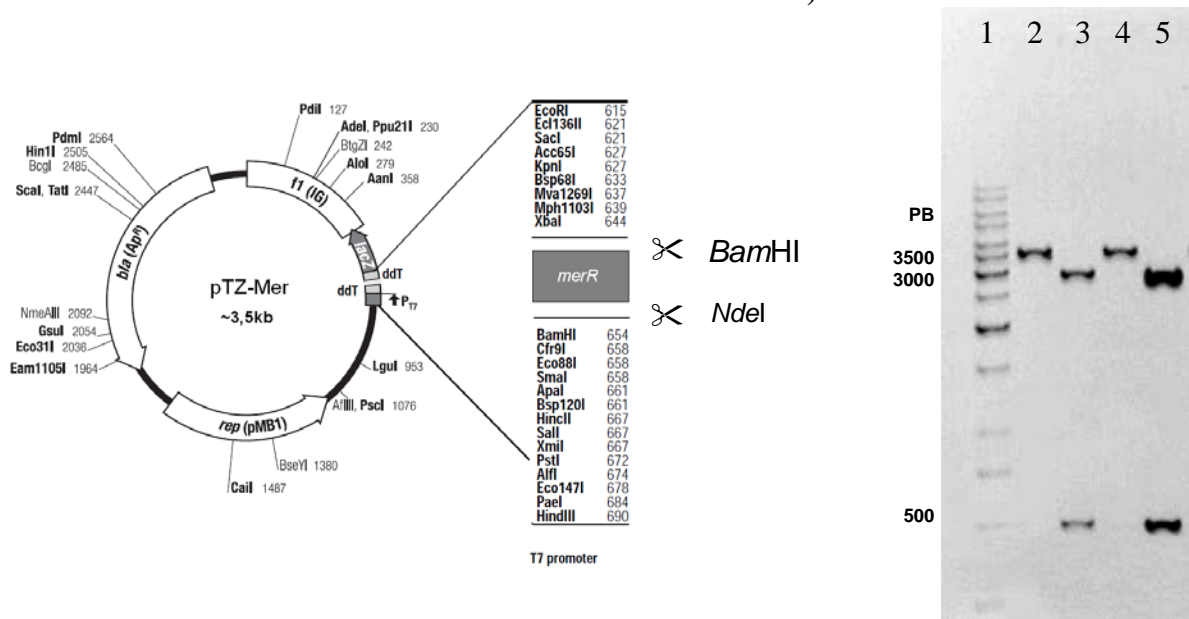


Figura 9 – A) Esquema da construção do plasmídeo pTZ-Mer; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA analisados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/μL (Fermentas); 2 e 4: pTZ-Mer digerido com *NdeI*; 3 e 5: pTZ-Mer digerido com *NdeI* e *XhoI*.

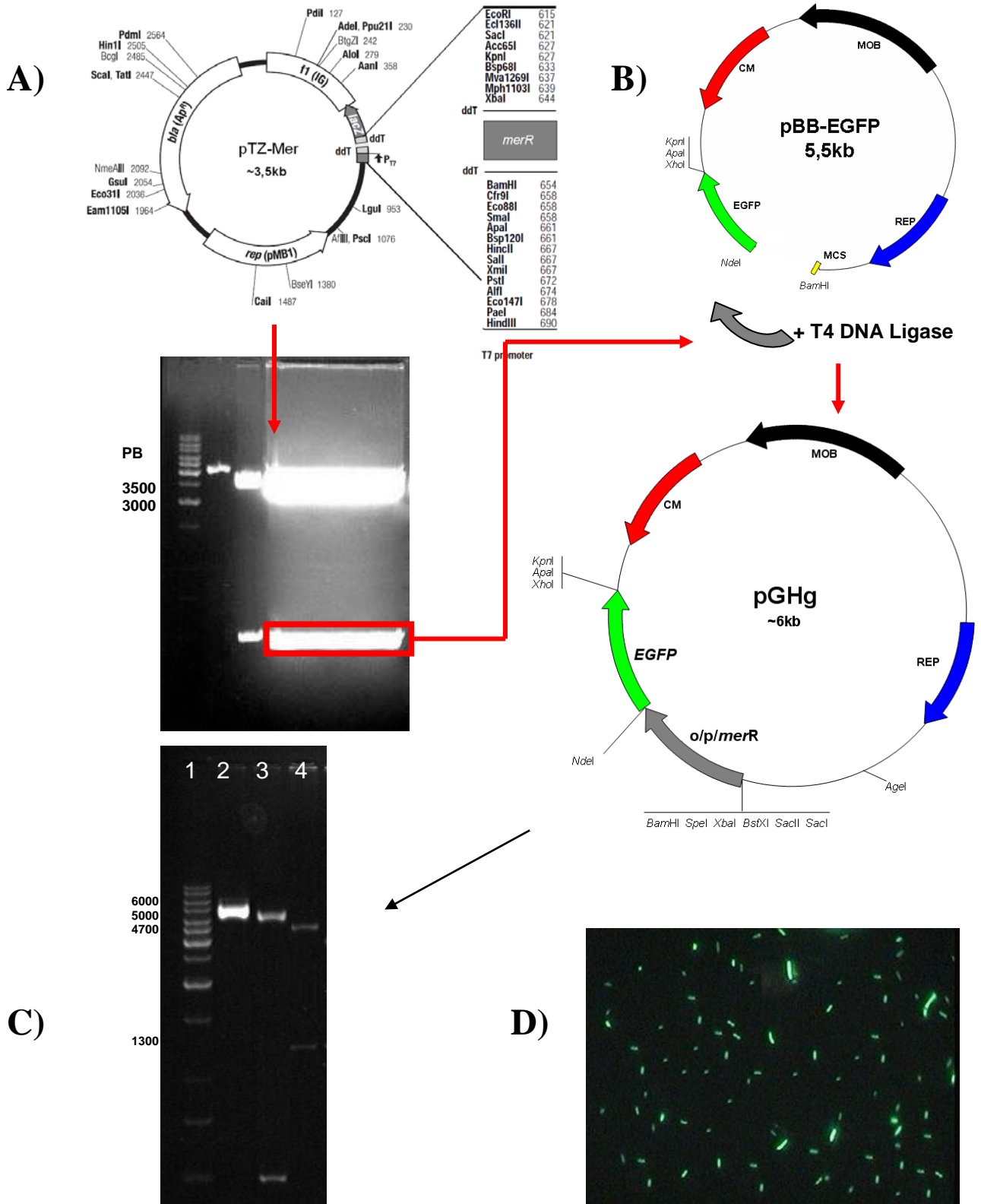


Figura 10 – A) Esquema da construção do plasmídeo pTZ-Mer e gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde 1: Ladder 1Kb Fermentas, 2: pTZ-Mer digerido com *NdeI*, 3 e 4: pTZ-Mer digerido com *NdeI* e *BamHI*; B) Esquema da construção do plasmídeo biossensor de íons mercúrio pGHg; C) Perfis de migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde 1: Ladder 1Kb Fermentas, 2: pGHg digerido com *NdeI*, 3: pGHg digerido com *NdeI* e *BamHI*, 4: pGHg digerido com *XhoI* e *BamHI*; D) Células recombinantes de *E. coli* DH5α / pGHg fluorescendo na presença de mercúrio (aumento de 1000X, microscopia de fluorescência, utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio).

A mistura de ligação vetor-inserto foi empregada para a transformação genética de células *E. coli* DH5 α , pelo método de eletroporação.

Algumas colônias bacterianas, resistentes ao cloranfenicol e escolhidas ao acaso, tiveram seus DNAs plasmidiais isolados, purificados e digeridos com *Nde*I. Este plasmídeo recombinante foi chamado de pGHg. Um plasmídeo recombinante, que se encaixava no perfil desejado (Figura 10C) foi selecionado para análises mais detalhadas. Foi observado que as células recombinantes *E. coli* DH5 α / pGHg fluorescem na presença de mercúrio (microscopia de fluorescência, aumento de 1000X, utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio e câmera CCD Hitachi KP-D581) (Figura 10D).

O plasmídeo pGHg também foi empregado na transformação genética de *C. metallidurans* CH34.

4.1.2 Análise quantitativa da expressão do gene *EGFP* dos clones recombinantes *E. coli* DH5 α / pGHg e *C. metallidurans* CH34 / pGHg

Os clones recombinantes foram inoculados e cultivados de acordo com o item 3.14 e 3.14.1. Para a avaliação por citometria de fluxo, as amostras foram diluídas à 1×10^{-6} e transferidas para microtubos de 1,5 ml, onde a expressão do gene *EGFP* dos clones recombinantes foi quantificada. As leituras das intensidades de fluorescências relativas (IFR) emitidas estão apresentadas nas Figuras 11, 12, 13 e 14.

O clone *C. metallidurans* CH34 / pGHg inoculado em H₂O tem baixa expressão do gene *EGFP*, sendo pouco significativa, mas *C. metallidurans* CH34 / pGHg inoculado em Caldo Nutriente foi capaz de detectar íons mercúrio na faixa compreendida entre 80 a 0,1563 μ M de HgCl₂, com altas leituras de IFR, chegando a picos de 360.

Já o clone *E. coli* DH5 α / pGHg inoculado em H₂O obteve excelente desempenho na expressão, detectando íons mercúrio na faixa compreendida entre 625 a 0,0024 nM de HgCl₂, com altas taxas de fluorescência, chegando a 540 IFR. Quando inoculado em Caldo Nutriente, *E. coli* DH5 α / pGHg foi capaz de detectar íons mercúrio na faixa ou pouco menor, entre 625 a 2,441 nM de HgCl₂.

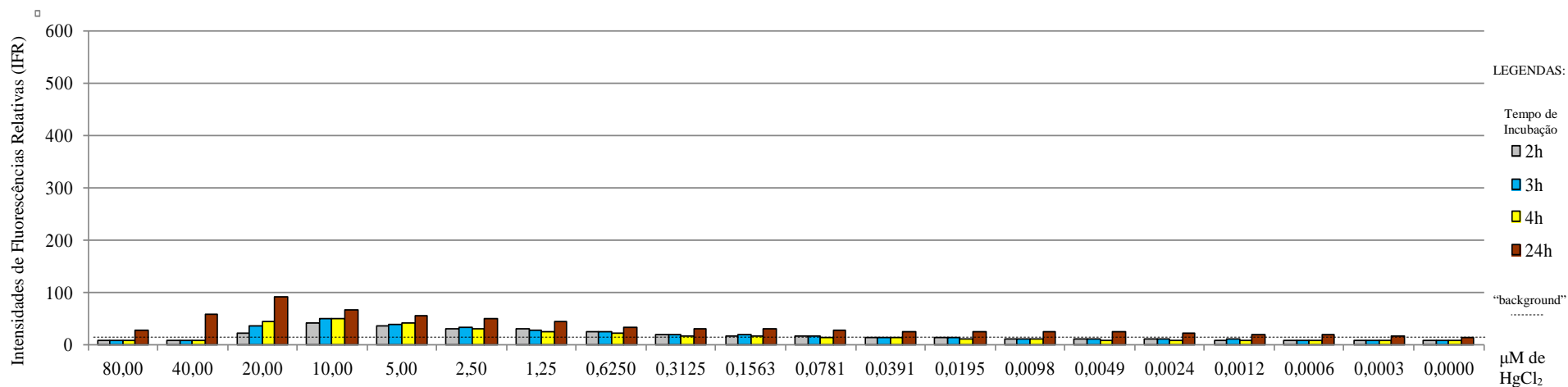


Figura 11 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *C. metallidurans* CH34/pGHg inoculado em H₂O, com diferentes concentrações de HgCl₂, no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 28 °C.

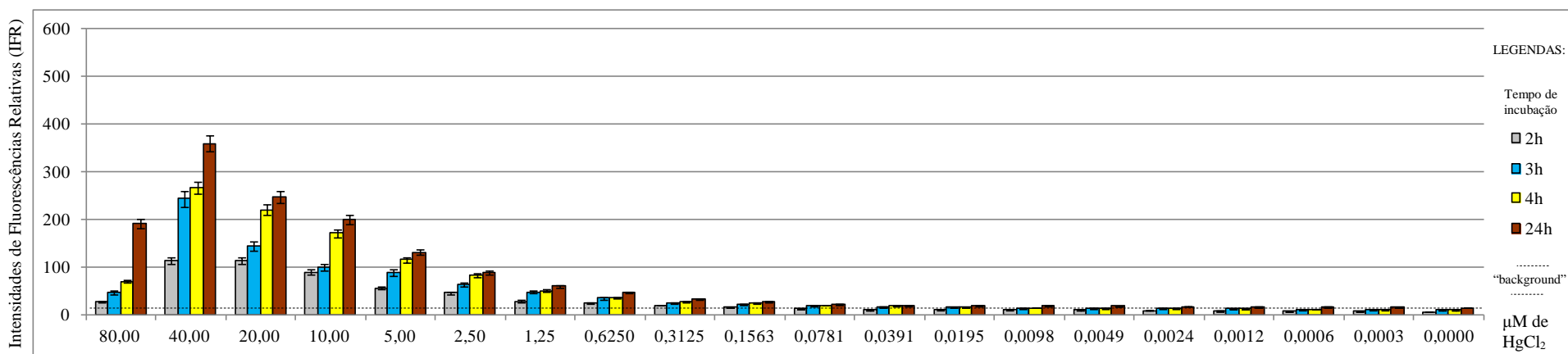


Figura 12 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *C. metallidurans* CH34/pGHg inoculado em Caldo Nutriente, com diferentes concentrações de HgCl₂, no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 28 °C.

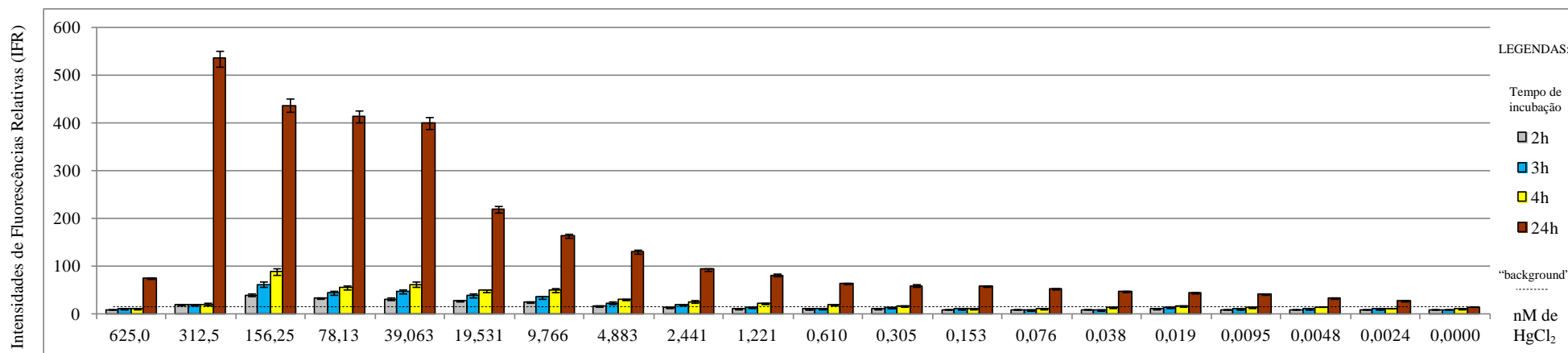


Figura 13 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *E. coli* DH5α/pGHg inoculado em H₂O, com diferentes concentrações de HgCl₂, no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 37 °C.

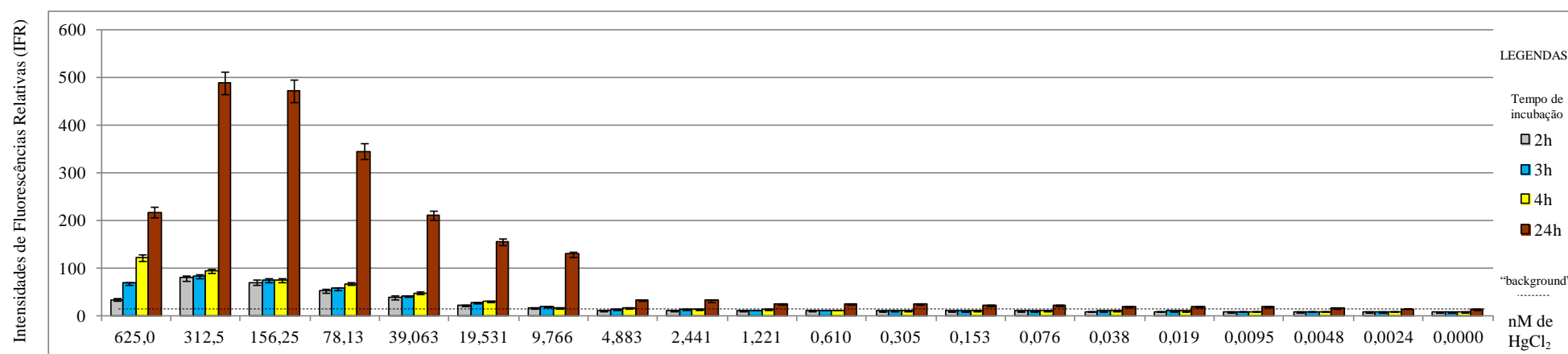


Figura 14 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *E. coli* DH5α/pGHg inoculado em Caldo Nutriente, com diferentes concentrações de HgCl₂, no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 37 °C.

4.2 Biossensor de Arsênio.

4.2.1 Construção do plasmídeo pGAs – Biossensor de As³⁺

Para a obtenção do plasmídeo biossensor de As³⁺ (pGAs) foram realizadas as manipulações esquematizadas na Figura 15 e 16, apresentadas a seguir.

O fragmento de DNA correspondente ao gene *OP/arsR*, foi amplificado por PCR. Para tanto, foram empregados o DNA total de *C. metallidurans* CH34, como molde, e os oligonucleotídeos iniciadores *arsR*-primerF (com o sítio da enzima *Pst*I): e *arsR*-primerR (com o sítio *Nde*I) (Tabela 4).

O fragmento de DNA obtido, foi ligado ao vetor pTZ57R/T, (Figura 15A). A mistura de ligação foi empregada na transformação genética, por eletroporação, de células *E. coli* DH5 α .

Algumas colônias bacterianas, resistentes à ampicilina e escolhidas ao acaso, tiveram seus DNAs plasmidiais isolados, purificados e digeridos com *Nde*I. Os plasmídeos extraídos de dois clones recombinantes que se encaixavam aos perfis desejados foram selecionados para análises mais detalhadas. Estes plasmídeos recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I, *Xho*I e analisados em gel de agarose submetido a eletroforese, confirmando-se a construção do plasmídeo desejado pTZ-Ars (Figura 15B).

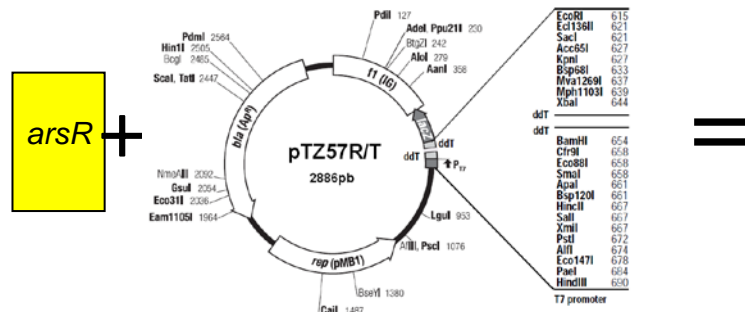
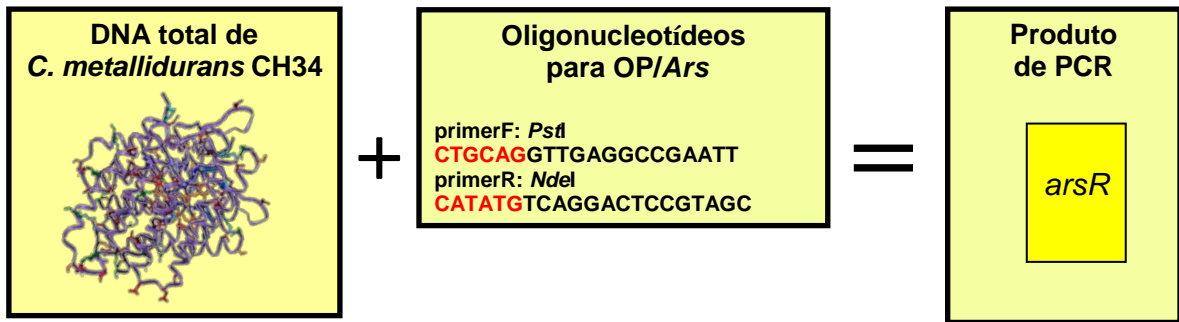
Para a construção do plasmídeo pGAs, os plasmídeos pTZ-Ars e pBB-EGFP foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I e *Sac*I. O fragmento *OP/arsR* liberado e o plasmídeo pBB-EGFP previamente digerido foram purificados e usados na mistura de ligação, utilizando a enzima T4 DNA ligase (Figura 16A).

A mistura de ligação vetor-inserto foi empregada para a transformação genética de células *E. coli* DH5 α , pelo método de eletroporação.

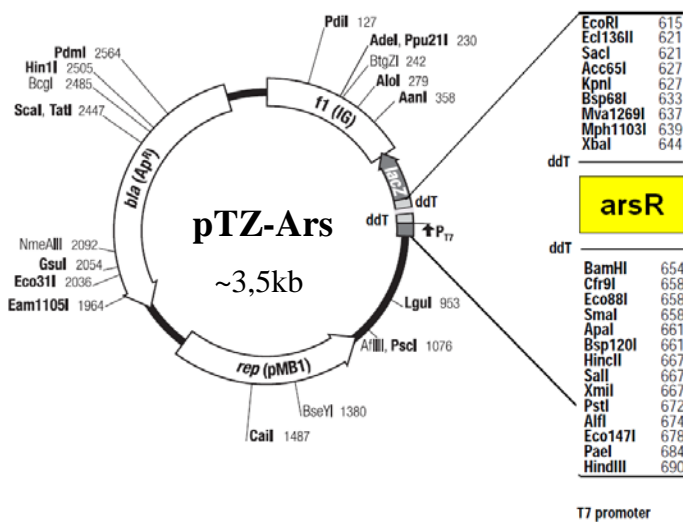
Algumas colônias bacterianas, resistentes ao cloranfenicol, escolhidas ao acaso, tiveram seus DNAs plasmidiais isolados, purificados e digeridos com *Nde*I. Um plasmídeo recombinante, que se encaixava no perfil desejado foi selecionado para análises mais detalhadas. Este plasmídeo recombinante foi digerido com as enzimas de restrição *Nde*I, *Sac*II, *Sal*II, *Xho*I e analisado em gel de agarose submetido a eletroforese (Figura 16B). O novo plasmídeo foi denominado pGAs.

O plasmídeo pGAs também foi empregado na transformação genética de *C. metallidurans* CH34.

A)



B)



B)

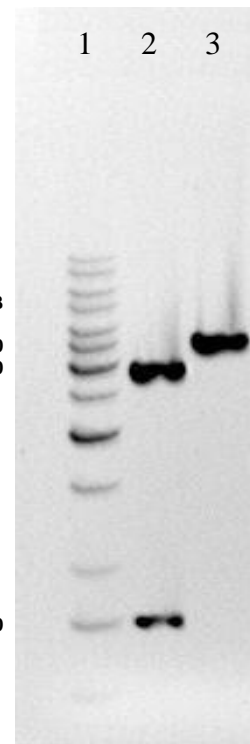


Figura 15 – A) Esquema da construção do plasmídeo pTZ-Ars; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA analisados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/μL (Fermentas); 2: pTZ-Ars digerido com *NdeI* e *XhoI*; 3: pTZ-Ars digerido com *NdeI*.

A)

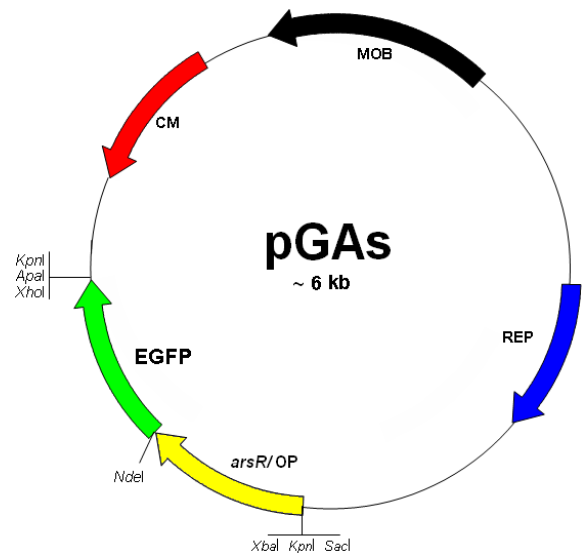
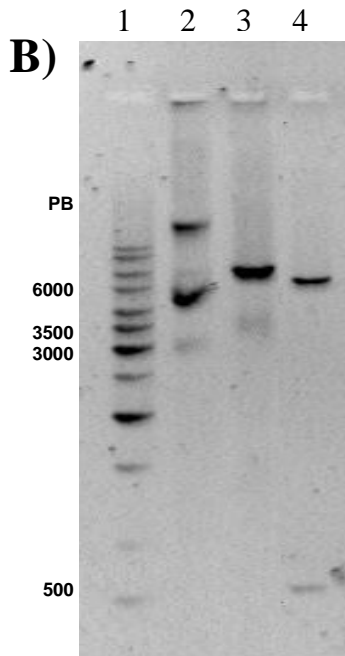
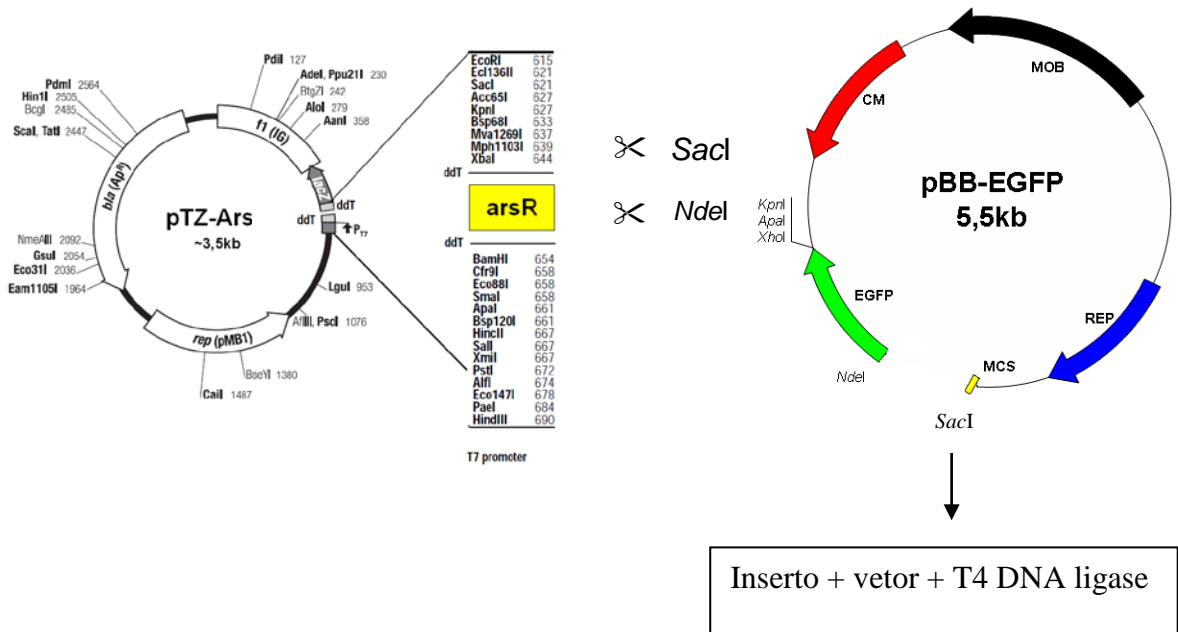


Figura 16 - A) Esquema da construção dos plasmídeos pGAS; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/μL (Fermentas); 2 pGAS-Cm não digerido; 3: pGAS-Cm digerido com *NdeI*; 4- pGAS-Cm digerido com *NdeI* e *SacI*.

4.2.3 Análise quantitativa da expressão do gene *EGFP* dos clones recombinantes *E. coli* DH5 α / pGAs e *C. metallidurans* CH34 / pGAs

Os clones recombinantes foram inoculados e cultivado de acordo com o item 3.14 e 3.14.2. Para a avaliação por citometria de fluxo, as amostras foram diluídas à 1×10^{-6} e transferidas para microtubos de 1,5 ml, onde a expressão do gene *EGFP* dos clones recombinantes foi quantificada. As leituras das intensidades de fluorescências relativas (IFR) emitidas estão apresentadas nas Figuras 17, 18, 19 e 20.

O clone *C. metallidurans* CH34 / pGAs inoculado em Caldo Nutriente foi capaz de detectar íons arsênio na faixa compreendida entre 200 a 0,0244 mM de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, com picos de 165 IFR.

Já os clones *C. metallidurans* CH34 / pGAs inoculado em H_2O e *E. coli* DH5 α / pGAs inoculado em H_2O e Caldo Nutriente, não obtiveram significativa expressão do *EGFP*, consequentemente baixos valores de IFR.

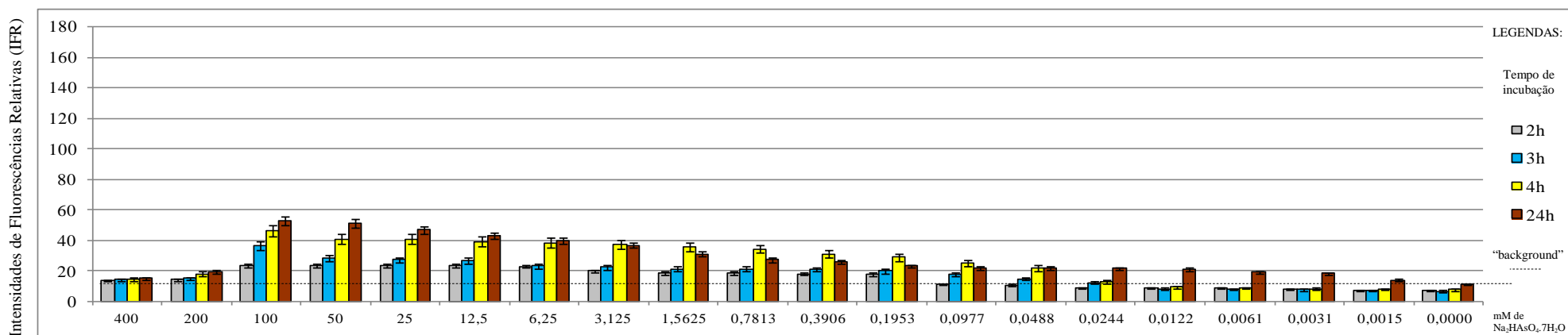


Figura 17 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *C. metallidurans* CH34/pGAs inoculado em H_2O , em concentrações variadas de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 28 °C.

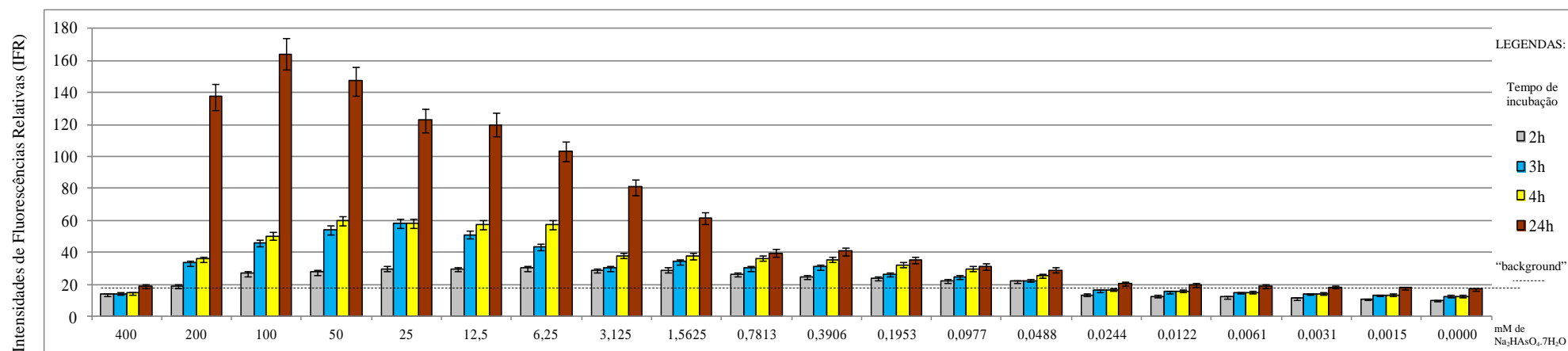


Figura 18 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *C. metallidurans* CH34/pGAs inoculado em Caldo Nutriente, em concentrações variadas de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 28 °C.

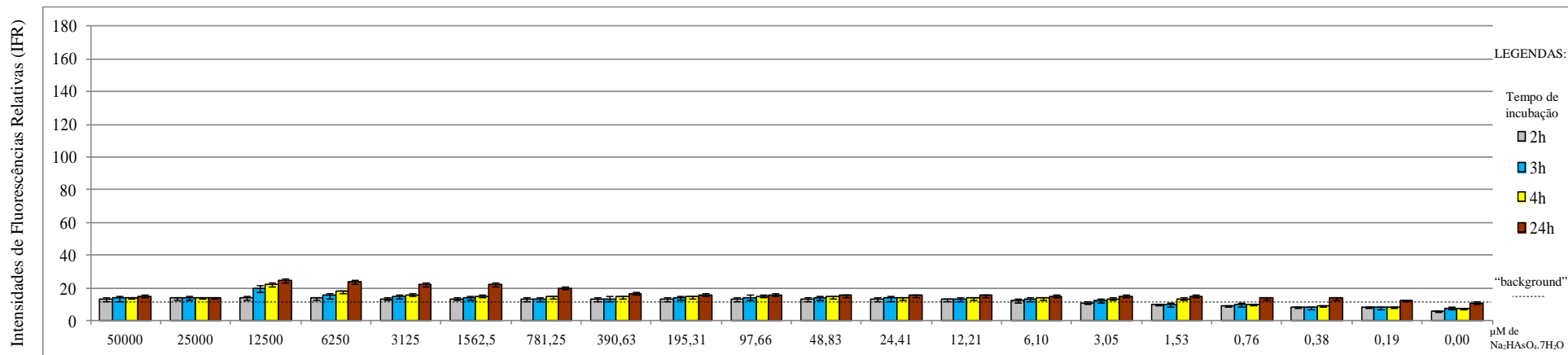


Figura 19 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *E. coli* DH5α CH34/pGAs inoculado em H₂O, em concentrações variadas de Na₂HAsO₄.7H₂O, no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 37 °C.

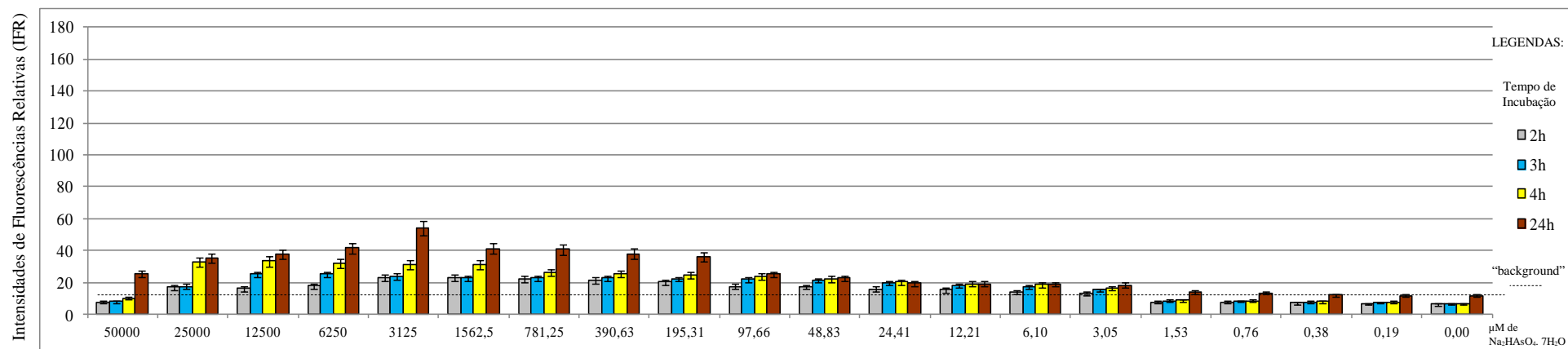


Figura 20 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *E. coli* DH5α CH34/pGAs inoculado em Caldo Nutriente, em concentrações variadas de Na₂HAsO₄.7H₂O, no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 37 °C.

4.3 Biossensor de Chumbo.

4.3.1 Construção do plasmídeo pGPb – Biossensor de Pb²⁺

Para a obtenção do plasmídeo biossensor de Pb²⁺ (pGPb), foram realizadas as manipulações esquematizadas nas Figuras 21e 22, apresentadas a seguir.

O fragmento de DNA correspondente ao gene *pbrR*/OP foi obtido por PCR. Para tanto, foram empregados o DNA total de *C. metallidurans* CH34, como molde e os oligonucleotídeos *pbrR*-primerF (com o sítio da enzima *Bam*HI) e *pbrR*-primerR (com o sítio *Nde*I): (Tabela 4).

O amplicom *pbrR*/OP obtido por PCR foi ligado ao vetor pTZ57R/T (Figura 21A). A mistura de ligação foi empregada na transformação genética, por eletroporação, de células *E. coli* DH5 α .

Algumas colônias bacterianas, resistentes à ampicilina, escolhidas ao acaso, tiveram seus DNAs plasmidiais isolados e purificados. Os plasmídeos extraídos de clones recombinantes que se encaixavam aos perfis desejados foram selecionados para análises mais detalhadas. Estes plasmídeos recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I, *Sac*I, *Xba*I e *Bam*HI, analisados em gel de agarose, confirmando-se a construção do plasmídeo desejado pTZ-Pbr (Figura 21B).

Para a construção do plasmídeo pGPb, os plasmídeos pBB-EGFP e pTZ-Pbr foram, primeiramente, digeridos com as enzimas *Nde*I e *Sac*I. Em seguida, foi realizada um mistura de ligação do fragmento *pbrR*/OP e o vetor pBB-EGFP digerido (Figura 22A).

A mistura de ligação foi empregada na transformação genética de células *E. coli* DH5 α , pelo método de eletroporação.

Colônias bacterianas, resistentes ao cloranfenicol, escolhidas ao acaso, tiveram seus DNAs plasmidiais isolados, purificados e digeridos com *Nde*I. Um plasmídeo recombinante, que se encaixava no perfil desejado foi selecionado para análises mais detalhadas. Este plasmídeo recombinante foi chamado de pGPb (Figura 22B).

O plasmídeo pGPg também foi empregado na transformação genética de *C. metallidurans* CH34.

A)

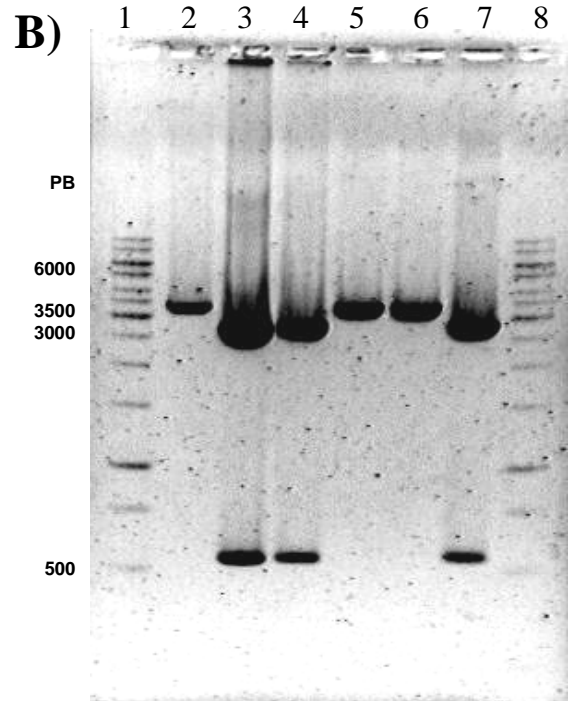
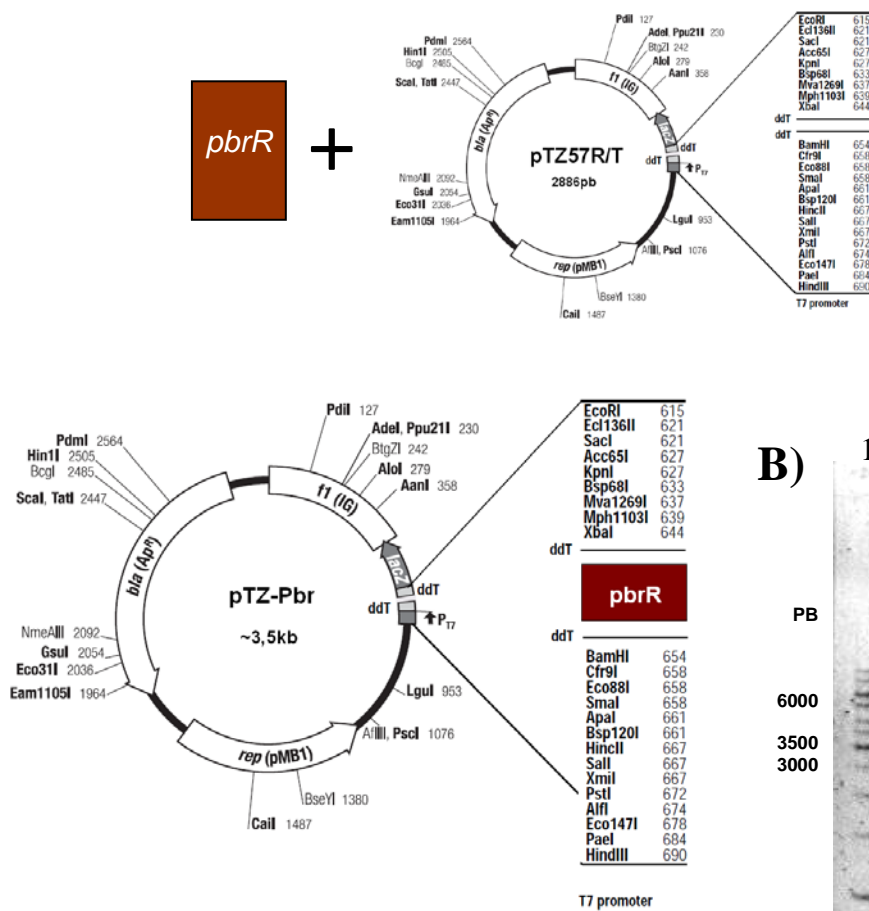
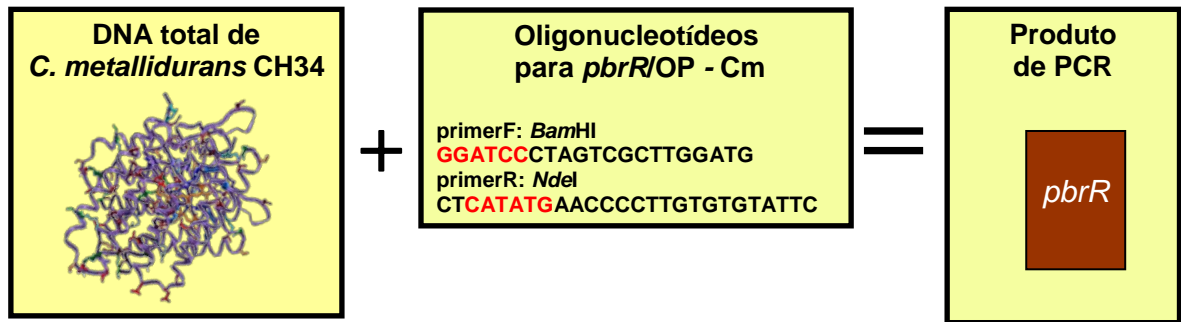


Figura 21 – A) Esquema da construção do plasmídeo pTZ-Pbr; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1 e 8: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/μL (Fermentas); 2 a 7 pTZ-Pbr digeridos, sendo: 2- *NdeI*; 3- *NdeI* e *SacI*; 4- *NdeI* e *XbaI*; 5- *XbaI*; 6- *BamHI*.; 7- *NdeI* e *BamHI*.

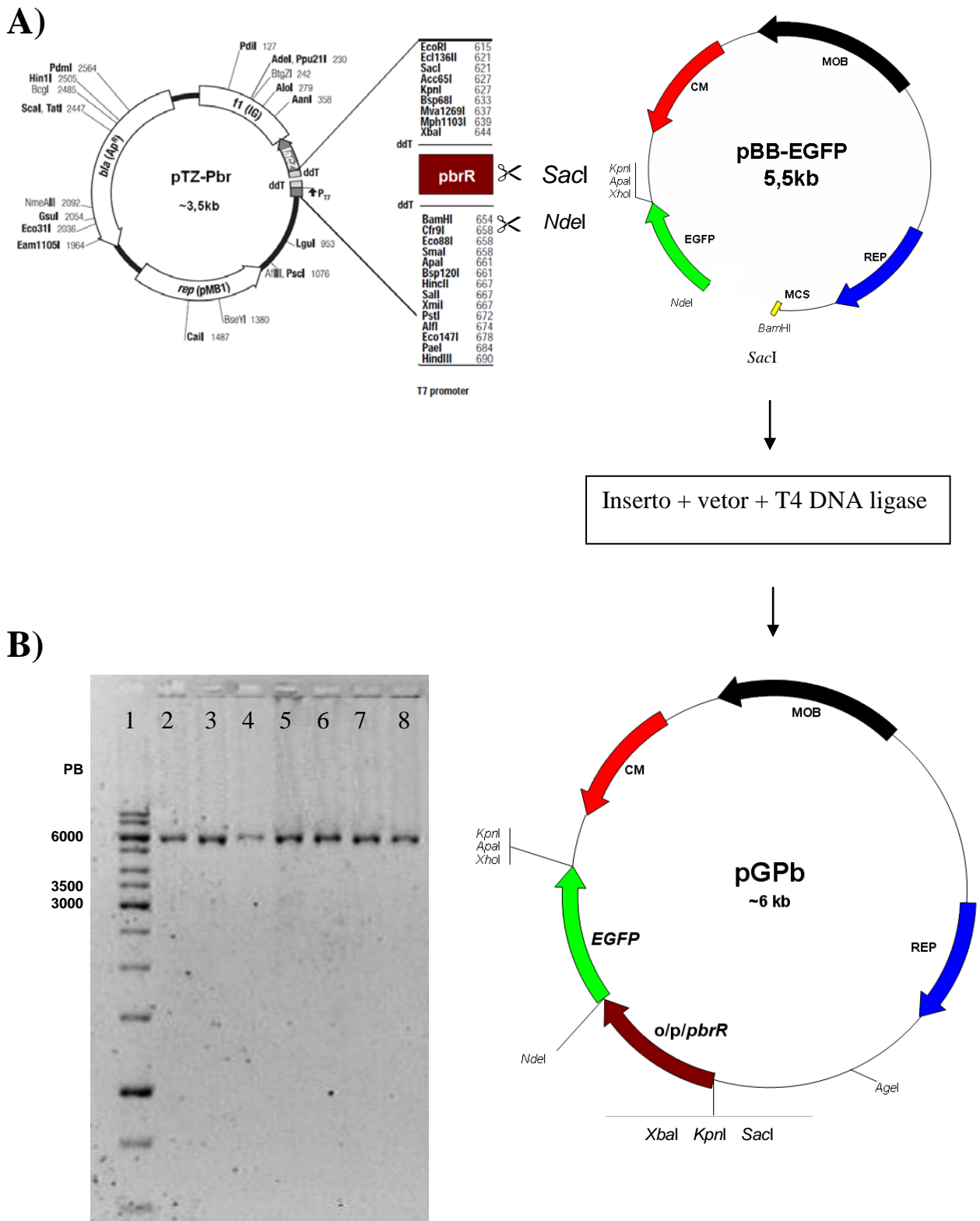


Figura 22 – A) Esquema da construção do plasmídeo pGPb; B) Perfis de migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, submetido à corrida eletroforética, onde, 1: Marcador de tamanho molecular – Ladder 1kb 50ng/μL (Fermentas); 2 a 8 plasmídeos pGPb digeridos com *NdeI*.

4.3.2 Análise quantitativa da expressão do gene *EGFP* dos clones recombinantes *E. coli* DH5 α / pGPb e *C. metallidurans* CH34 / pGPb

Os clones recombinantes foram inoculados e cultivado de acordo com o item 3.14 e 3.14.3. Para a avaliação por citometria de fluxo, as amostras foram diluídas à 1×10^{-6} e transferidas para microtubos de 1,5 ml, onde a expressão do gene *EGFP* dos clones recombinantes foi quantificada. As leituras das intensidades de fluorescências relativas (IFR) emitidas estão apresentadas nas Figuras 23, 24, 25 e 26.

O clone *C. metallidurans* CH34 / pGPb inoculado em H₂O foi capaz de detectar íons chumbo na faixa compreendida entre 625 a 0,31 μ M de Pb(NO₃)₂, com 225 IFR.

Já os clones *C. metallidurans* CH34 / pGPb inoculado em Caldo Nutriente e *E. coli* DH5 α / pGPb inoculado em H₂O e Caldo Nutriente, não obtiveram significativa expressão do *EGFP*, consequentemente baixos valores de IFR.

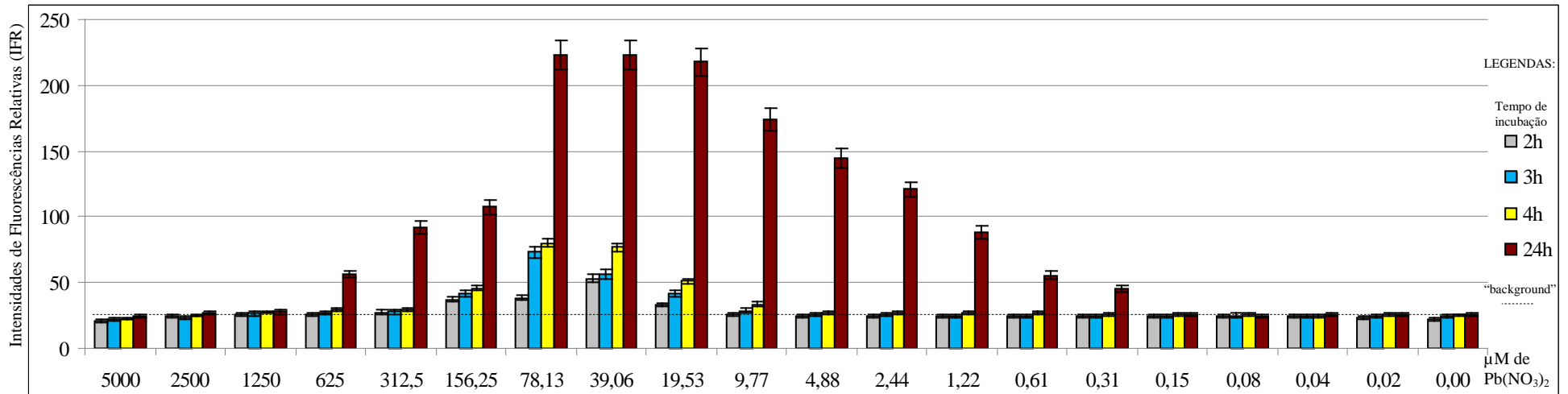


Figura 23 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *C. metallidurans* CH34/pGPb inoculado em H₂O, em concentrações variadas de Pb(NO₃)₂, no intervalo de tempo de 2 h, 3 h, 4 h e 24 h, incubado à 28 °C.

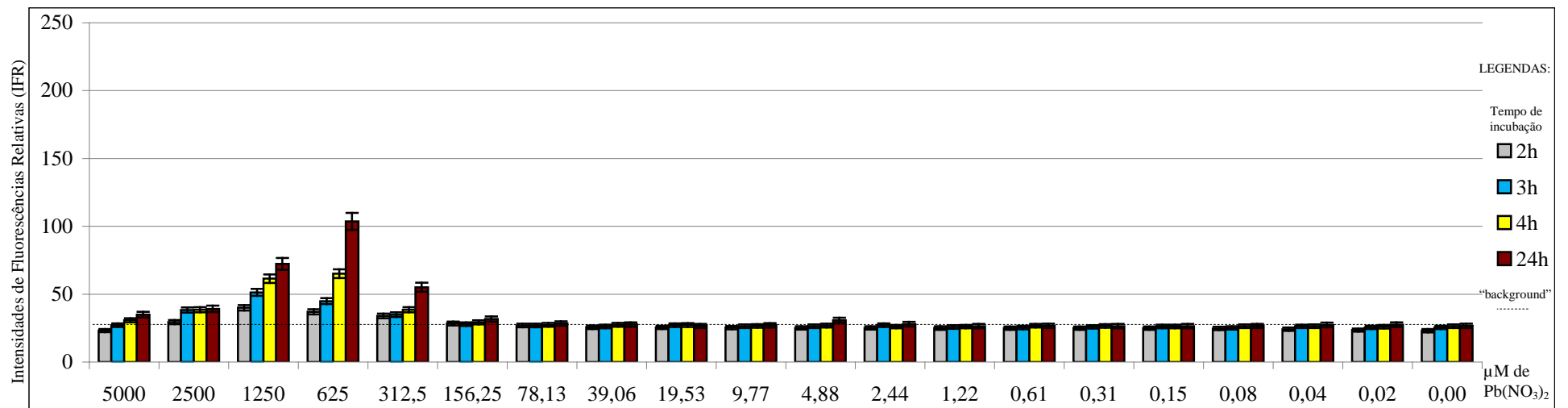


Figura 24 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *C. metallidurans* CH34/pGPb inoculado em Caldo Nutriente, em concentrações variadas de Pb(NO₃)₂, no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 28 °C.

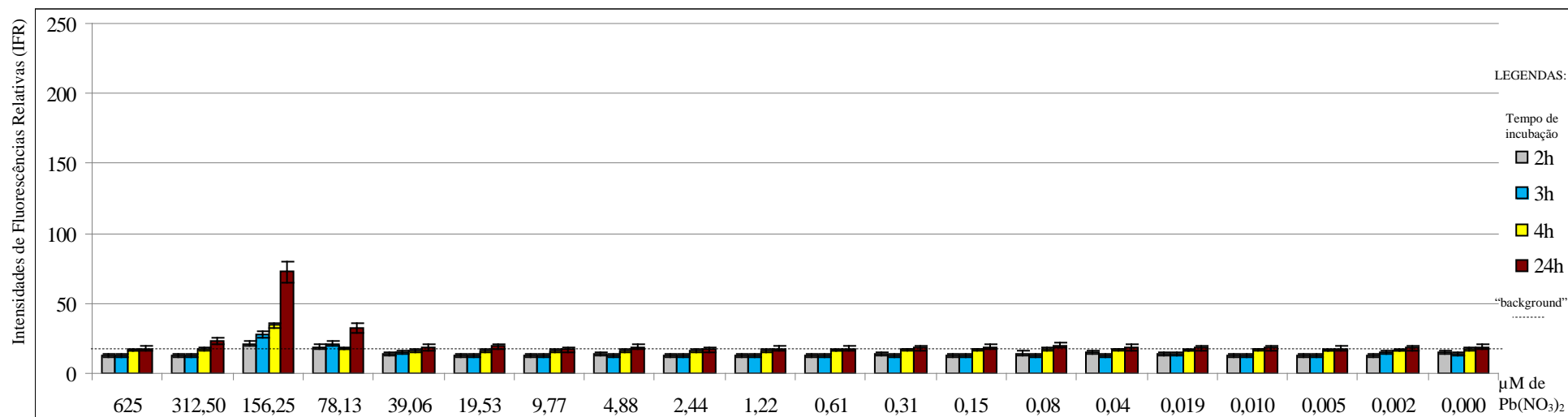


Figura 25 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *E. coli* DH5α/pGPb inoculado em H₂O, em concentrações variadas de Pb(NO₃)₂, no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 37 °C.

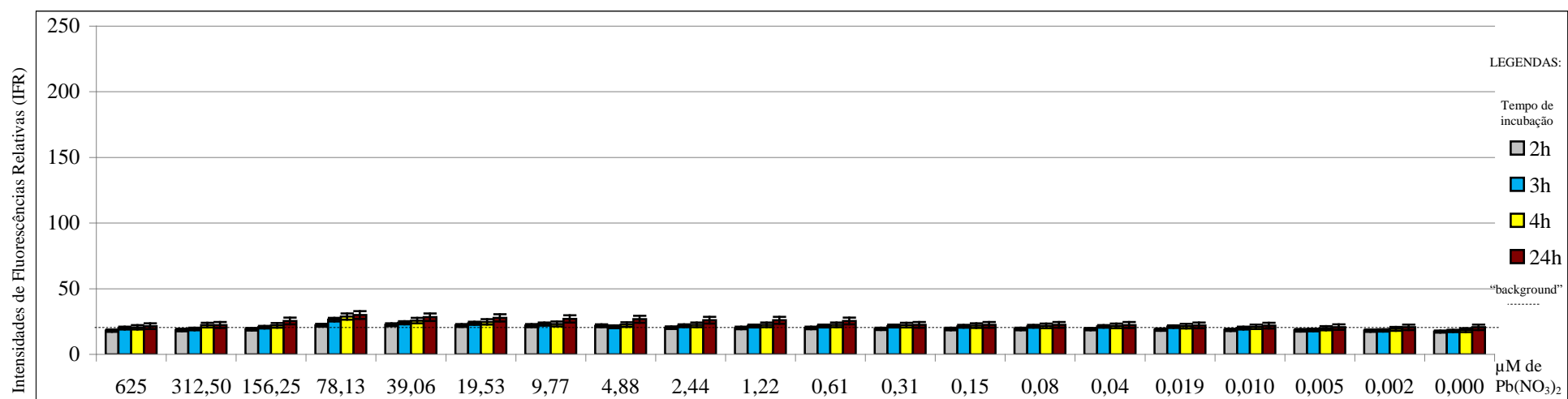


Figura 26 - Gráfico das diferentes intensidades de fluorescência do clone *E. coli* DH5α/pGPb inoculado em Caldo Nutriente, em concentrações variadas de Pb(NO₃)₂, no intervalo de tempo de 2h, 3h, 4h e 24h, incubado à 37 °C.

Os metais mercúrio, arsênio, chumbo são altamente tóxicos ao organismo humano (Tabela 1). De acordo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2010):

- A principal via de exposição humana ao mercúrio é o consumo de pescados (e mamíferos marinhos) contaminados por metilmercúrio (MeHg). O MeHg, que é a forma mais tóxica do mercúrio, bioacumula nos animais, havendo biomagnificação na cadeia alimentar.
- Mais de 80% do chumbo que ingressa no organismo é oriundo da ingestão de alimentos, sujeiras e poeira contendo o metal.

Um estudo publicado por Figueiredo (2009) aponta o teor de metais em solos superficiais de 14 parques públicos do município de São Paulo e revelou elevada presença de metais potencialmente tóxicos, principalmente chumbo e arsênio, comparados com os valores de referências da CETESB:

- A concentração de arsênio é de 39 mg/kg nos parques Ibirapuera, Aclimação, Trianon e Vila dos Remédios; 40mg/kg no parque Chico Mendes e 56 mg/kg no da Luz, valor de referência 35 mg/kg.
- Foram encontradas elevadas concentrações de chumbo nos parques Buenos Aires (439 mg/kg), Luz (209 mg/kg), Trianon (230 mg/kg) e Aclimação (260 mg/kg) – valor de referência 180 mg/kg.

Efluentes domésticos, industriais e de mineração possuem comumente uma mistura de metais, podendo haver a prevalência de um determinado metal (Biondo, 2008).

Sendo assim, biossensores bacterianos podem ser utilizados no monitoramento, biodisponibilidade e quantificação de mercúrio, arsênio e chumbo. Sendo assim, este trabalho, visou o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas e através de técnicas de engenharia genética, três biossensores bacterianos foram construídos, cada um deles especificamente capaz de detectar e quantificar os metais pesados mercúrio, arsênio e chumbo em amostras ambientais.

5.1 Expressão do gene *EGFP* nos três biossensores bacterianos

A maioria dos biossensores bacterianos descritos atualmente é o resultado da clonagem de um promotor a montante de um cassete de gene repórter e consequente

transferência da construção do plasmídeo em cepas específicas (Liu X, 2010). A escolha do gene *EGFP* foi importante porque:

- A proteína EGFP não altera a fisiologia bacteriana e não requer indutor para produzir fluorescência (Tauriainen et al., 1999);
- Como repórter, permitiu a obtenção de fluorescência estável e, portanto, aplicável em ensaios de curto e longo prazo (Li et al., 1997).

As análises quantitativas da expressão do gene *EGFP* nos três biossensores construídos mostraram a eficácia do plasmídeo pBB-EGFP (Quadros, 2007) (Figura 4), onde foi possível estabelecer técnicas muito parecidas para clonagem dos genes sensores.

5.2 Operons específicos de resistência são viáveis para a obtenção de biossensores

O mecanismo natural de resistência a mercúrio, arsênio e chumbo em *C. metallidurans* foi a principal chave no desenho da estratégia deste projeto, onde buscou-se por empregar como fragmentos de DNA sensíveis aos íons mercúrio – *merR*/OP (Mergeay et al., 2003), arsênio – OP/*arsR* (Zhang et al., 2009) e chumbo – *pbrR*/OP (Borremans et al. 2001), sequências específicas do genoma *C. metallidurans* CH34. Foram escolhidas as regiões operadora/promotoras e os genes sensores respectivos, o que permitiu as fusões à montante da região estrutural do gene *EGFP* (Figura 27) do plasmídeo pBB-EGFP, possibilitando a construção dos plasmídeos biossensores pGHg (Figura 10), pGAs (Figura 16) e pGPb (Figura 22).

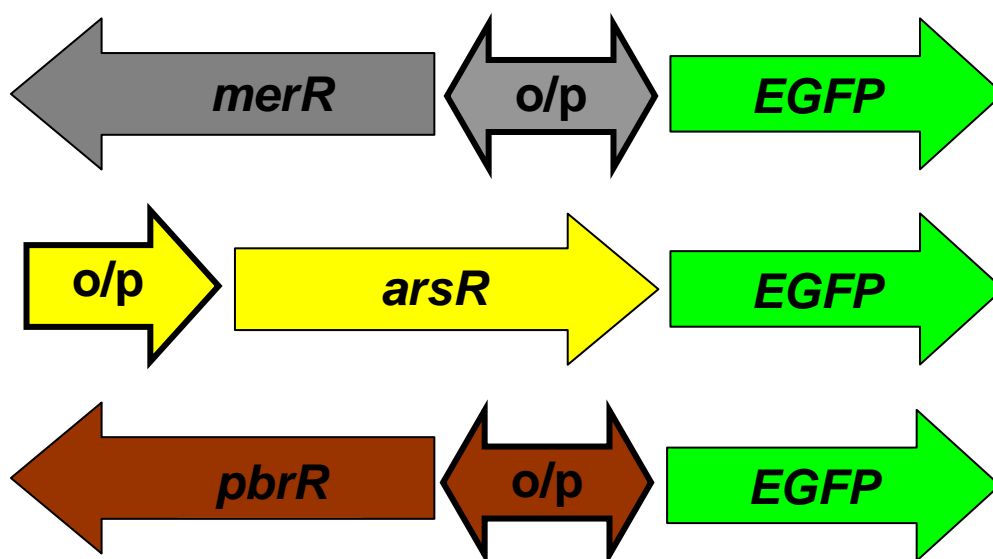


Figura 27 – Ilustração da técnica empregada onde as regiões operadora/promotoras e os genes sensores foram clonados à montante da região estrutural do gene *EGFP*.

Vale ainda destacar que, de acordo com nossas premissas, *C. metallidurans* CH34 possuindo mecanismo de regulação e resistência aos metais citados, quando hospedando os plasmídeos pGHg, pGAs e pGPb, mostrou grande capacidade biossensora na detecção e quantificação.

5.3 Tempo de inoculação e leitura das amostras

O parâmetro tempo de inoculação trouxe informações importantes. A detecção dos metais pôde ser percebida a partir de 2 horas de incubação. Uma vez que os biossensores ficaram expostos aos metais, a proteína EGFP teve uma produção contínua, sendo proporcional ao tempo exposição. Conseqüentemente, a quantificação da fluorescência após 24 horas de incubação mostrou altas taxas de IFR, o que possibilitou uma melhor determinação da faixa de quantificação dos metais. (Figuras 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25 e 26). Nenhum dos autores citados na Tabela 2 (Magrisso, 2008) apresentou uma variação no tempo de inoculação.

5.4 Viabilidade de inoculação dos biossensores bacterianos em água

A inoculação dos biossensores em água também mostrou a possibilidade da empregabilidade diretamente na amostra e em suas diluições. Uma economia de tempo no preparo de meios e no gasto de insumos para análises quantitativas. Outro fator favorável para a incubação em água é que o chumbo encontrado em compostos químicos facilmente se precipita em meios de cultura, dificultando a absorção bacteriana (Magrisso, 2009; Maier et. al, 2000; Mergeay, 1985; Nies, 1999). Nenhum dos principais biossensores bacterianos apresentados na Tabela 2 (Magrisso, 2008) traz esta inovação.

5.5 Aplicabilidade na quantificação dos biossensores frente aos valores de referência

Os biossensores bacterianos contruídos neste trabalho trazem novas perspectivas de detecção e quantificação de mercúrio, arsênio e chumbo. A Tabela 6 compara os resultados obtidos com os valores máximos permitidos para substâncias químicas que representam risco à saúde, admitidos pelo Ministério da Saúde - Portaria nº 518 (2004) e CONAMA – Resolução nº 357 (2005). Comparando com outros biossensores decritos na Tabela 2

(Magrisso, 2008) e com estratégias de clonagem parecidas (gene sensor específico, gene repórter, bactéria hospedeira, faixa de leitura na quantificação e tempo de indução), poucos apresentaram resultados compatíveis com os valores de referência citados. A Tabela 7 (adaptação das Tabelas 2 e 6) compara os valores obtidos neste trabalho com valores de outros autores.

Os resultados somados dos clones biossensores *E. coli* e *C. metallidurans* / pGHg, acoplados à técnica analítica empregada, foram capazes de detectarem a presença de íons Hg^{2+} na faixa entre 80 μM até 2,4 pM. Os clones *C. metallidurans* / pGAs e *C. metallidurans* / pGPb também obtiverem excelentes resultados, pois ambos foram capazes de detectar e quantificar valores dentro das referências de potabilidade, pertimindo assim suas aplicabilidades (Tabela 6).

Tabela 6 - Capacidade de quantificação dos biossensores bacterianos construídos neste trabalho.

Plasmídeo	Bactéria hospedeira	Substrato de Incubação	Faixa de quantificação (após 24h de incubação)	Valor máximo permitido*
pGHg	<i>C. metallidurans</i>	H ₂ O	Não se aplica	4,985 μM
		Caldo nutriente	80 a 0,1563 μM de HgCl₂	
	<i>E. coli</i>	H ₂ O	625 a 0,0024 nM de HgCl₂	
		Caldo nutriente	625 a 2,441 nM de HgCl₂	
pGAs	<i>C. metallidurans</i>	H ₂ O	Não se aplica	0,1335 mM
		Caldo nutriente	200 a 0,0244 mM de Na₂HAsO₄.7H₂O	
	<i>E. coli</i>	H ₂ O	Não se aplica	
		Caldo nutriente	Não se aplica	
pGPb	<i>C. metallidurans</i>	H ₂ O	615 a 0,31 μM de Pb(NO₃)₂	48,3 μM
		Caldo nutriente	Não se aplica	
	<i>E. coli</i>	H ₂ O	Não se aplica	
		Caldo nutriente	Não se aplica	

Fontes: * Ministério da Saúde - Portaria nº 518 (2004); CONAMA – Resolução nº 357 (2005)

Tabela 7 – Comparação dos valores obtidos neste trabalho com valores de outros autores.

Gene sensor	Metal	Gene Repórter	Bactéria hospedeira	Faixa de quantificação	Tempo de incubação	Referência
<i>merR</i>	Hg	<i>GFP</i>	<i>E. coli</i>	500 a 5 μ M	8 h	Hakkila et al. (2002)
		<i>EGFP</i>	<i>E. coli</i>	625 a 0,0024 nM	24 h	Este trabalho
		<i>EGFP</i>	<i>C. metallidurans</i>	80 a 0,1563 μ M	24 h	Este trabalho
<i>arsR</i>	As	<i>GFP</i>	<i>E. coli</i>	25 a 0,4 mM	120 min	Liao e Ou (2005)
			<i>E. coli</i>	133 a 0,13 mM	12 h	Roberto et al. (2002)
		<i>EGFP</i>	<i>C. metallidurans</i>	200 a 0,0244 mM	24 h	Este trabalho
<i>pbrR</i>	Pb	<i>GFP</i>	<i>E. coli</i>	400 a 50 μ M	12 h	Chakraborty et al. (2008)
		<i>EGFP</i>	<i>C. metallidurans</i>	615 a 0,31 μ M	24 h	Este trabalho

5.6 Considerações finais

Tomados em conjunto, os dados obtidos indicam que os objetivos deste trabalho foram atingidos, onde através de técnicas de engenharia genética, três biossensores bacterianos, cada um deles especificamente capaz de detectar e quantificar os metais pesados mercúrio, arsênio e chumbo.

Os plasmídeos pGHg, pGAs e pGPb (uma vez que estes plasmídeos possuem um amplo-espectro para transformação de bactérias Gram-negativas; gene de resistência ao cloranfenicol; possibilidade de transformação por conjugação) caso sejam introduzidos noutras bactérias Gram-negativas, cujo o patrimônio genético garante-lhe maior resistência aos íons metálicos, potencialmente haverá a possibilidade de construção de novas bactérias recombinantes com capacidade de detecção e quantificação dentro de uma faixa mais ampla de concentração.

6.1 Biossensor de Mercúrio

- O fragmento de DNA correspondente aos genes *merR/OP* de *C. metallidurans* CH34 foi amplificado, com sucesso, empregando-se a técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos desenhados neste trabalho. Este fragmento de DNA foi clonado, com sucesso, no vetor pTZ57R/T, obtendo o plasmídeo pTZ-Mer;
- O fragmento de DNA sensível a presença de íons Hg^{2+} (*merR/OP*) foi inserido à montante do gene *EGFP* no vetor caça promotor pBB-EGFP, originando o plasmídeo biossensor **pGHg**.
- Os Clones *E. coli* DH5 α / pGHg e *C. metallidurans* CH34 / pGHg expressam a proteína EGFP na presença de íons Hg^{2+} , demonstrando a funcionalidade do biossensor de mercúrio construído;
- Os resultados somados dos clones biossensores *E.coli* e *C. metallidurans* / pGHg, acoplados à técnica analítica empregada, foram capazes de detectarem a presença de íons Hg^{2+} na faixa entre 80 μ M até 1,2 pM.

6.2 Biossensor de Arsênio

- O fragmento de DNA correspondente aos genes *OP/arsR* de *C. metallidurans* CH34 foi amplificado, com sucesso, empregando-se a técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos desenhados neste trabalho. Este fragmento de DNA foi clonado, com sucesso, no vetor pTZ57R/T, obtendo o plasmídeo pTZ-Ars;
- O fragmento de DNA sensível a presença de íons As^{2+} (*OP/arsR*) foi inserido a montante do gene *EGFP* no vetor caça promotor pBB-EGFP, originando o plasmídeo biossensor **pGAs**.
- Os Clones *E. coli* DH5 α / pGAs e *C. metallidurans* CH34 / pGAs expressam a proteína EGFP na presença de íons As^{3+} , demonstrando a funcionalidade do biossensor de arsênio construído;

- O clone recombinante *C. metallidurans* CH34 / pGAs apresentou melhores resultados de IFR como biossensor de arsênio do que a linhagem recombinante *E. coli* DH5 α / pGAs;

6.3 Biossensor de Chumbo

- O fragmento de DNA correspondente aos genes *pbrR/OP* de *C. metallidurans* CH34 foi amplificado, com sucesso, empregando-se a técnica de PCR, utilizando oligonucleotídios desenhados neste trabalho. Este fragmento de DNA foi clonado, com sucesso, no vetor pTZ57R/T, obtendo o plasmídeo pTZ-Pbr;
- O fragmento de DNA sensível a presença de íons Pb²⁺ (*pbrR/OP*) foi inserido a montante do gene *EGFP* no vetor caça promotor pBB-EGFP, originando o plasmídeo biossensor **pGPb**.
- Não houve uma de detecção significativa de íons Pb²⁺ pelo clone recombinante *E. coli* DH5 α / pGPb,
- O clone recombinante *C. metallidurans* CH34 / pGPb expressa a proteína EGFP na presença de íons Pb²⁺, demonstrando a funcionalidade do biossensor de chumbo construído;

REFERÊNCIAS*

- Alfaya AAS, Kubota LT. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Quim Nova*. 2002;25(5):835-41.
- Barra CM, Santelli RE, Abrão JJ, de la Guardia M. Especificação de arsênio - uma revisão *Quim Nova*. 2000:23-58.
- Ben-Israel O, Ben-Israel H, Ulizur S. Identification and quantification of toxic chemicals by use of *Escherichia coli* carrying *lux* genes fused to stress promoters. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:4346-52.
- Bhatia RB, Brinker CJ, Gupta AK, Singh AK. Aqueous sol-gel process for protein encapsulation. *Chem Mater*. 2000;12:2434-41.
- Biondo R. Engenharia Genética de *Cupriavidus metallidurans* para biorremediação de efluentes contendo metais pesados. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.
- Biran I, Babai R, Levkov K, Rishpon J, Ron EZ. Online and in situ monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium. *Environ Microbiol*. 2000;2(3):285-90.
- Bontidean I, Lloyd JR, Hobman JL, Wilson JR, Csoregi E, Mattiasson B, Brown NL. Bacterial metal-resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals. *J Inorg Biochem*. 2000;79:225-9.
- Bontidean I, Mortari A, Leth S, Brown NL, Karlson U, Larsen MM, et al. Biosensors for detection of mercury in contaminated soils. *Environ Pollut*. 2004;131:255-62.
- Borremans B, Hobman JL, Provoost A, Brown NL, Van der Lelie D. Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *Journal of Bacteriology*. 2001;183:5651-8.
- Boyanapalli R, Bullerjahn GS, Pohl C, Croot PL, Boyd PW, McKay R, Michael L. Luminescent whole-cell cyanobacterial bioreporter for measuring Fe availability in diverse marine environments. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:1019-24.
- Brasil. Ministério da Saúde. Norma de qualidade da água para consumo humano. Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004, [homepage on the Internet]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_518_2004.pdf [2011 set. 12].
- Brunis MR, Kapil S, Oehme WF. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2000;45:198-207.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Cai J, Dubow SM. Use of a luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA). *Biodegradation*. 1997;8:105-11.

Carlin A, Shi W, Dey S, Rosen B. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J Bacteriol*. 1995;177(4):981-6.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB. Informações toxicológicas. 2010 [homepage on the Internet]. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/tecnologia-ambiental/laboratorios/109-informacoes-toxicologicas>[2011 set. 12].

Chakraborty T, Babu PG, Alam A, Chaudhari A. GFP expressing bacterial biosensor to measure lead contamination in aquatic environment. *Curr Sci*.2008;94(6):800-5.

Champier L, Duarte V, Michaud-Soret I, Coves J. Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: a possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the *mer* operon. *Mol Microbiol*. 2004;52(5):1475-85.

Chang JC, Taylor PB, Leach FR. Use of the Microtox assay system for environmental samples. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1981;26(2):150-6.

Chatterjee J, Meighen EA. Biotechnical applications of bacterial bioluminescence (*lux*) genes. *Photochem Photobiol*. 1995;62:641-50.

Clontech. Living Colors Enhanced GFP Vectors: The brightest GFP chromophore variant for maximal sensitivity in mammalian cells. CLONTECHniques; 1996.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 [homepage on the Internet]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> [2011 set. 12].

Corbisier P, van der Lelie D, Borremans B, Provoost A, Lorenzo V, Brown NL, et al.. Whole cell and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Anal Chim Acta*. 1999;387:235-44.

Central Única dos Trabalhadores (CUT). Meio ambiente, saúde e trabalho: O movimento sindical pode ajudar a melhorar o ambiente. Comissão de Meio Ambiente.Rio de Janeiro, 2000 [homepage on the Internet]. Disponível em: <http://www.sindipetro.org.br/extra/cartilha-cut/10metaispesados.htm> [2011 set. 12].

de Lorenzo V, Kuenen G. Scientific basis for the bioremediation of the toxic spill of the Aznalcollar mine: combining bacteria and plants to address and intractable kind of pollution. *Environ Microbiol*. 1999;1(3):275-8.

Diels L, Lelie N. van der, Bastiaens L. New developments in treatment of heavy metal contaminated soils. *Rev Environ Sci Bio/Technol*. 2002;1:75-82

Diorio C, Cai J, Marmor J, Shinder R, DuBow MS. An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. 1995;177:2050-6.

D'Souza SF. Microbial biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2001;16(6):337-53.

DuBow MS. The detection and characterization of genetically programmed responses to environmental stress. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;851:286-91.

Errampalli D, Leung K, Cassidy MB, Kostrzynska M, Blears M, Lee H, Trevors JT. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *J Microbiol Methods.* 1999;35(3):187-99.

Figueiredo AMG, Enzwiler J, Camargo IMC, Sigolo JB, Gumiero FC, Pavese A, Millian FM. Metal contamination in urban park soils of São Paulo. *J Radioanal Nucl Chem.* 2009;280(2):423-9.

Golding GR, Kelly CA, Sparling R, Loewen PC, Rudd WMJ, Barkay T. Evidence for facilitated uptake of Hg(II) by *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* under anaerobic and aerobic conditions. *Limnol Oceanogr.* 2002;47:967-75.

Goyer RA. Toxic and essential metal interactions, *Annu. Rev. Nutr.* 1997;17:37-50

Grass G, Fricke B, Nies DH. Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations. *Biometals.* 2005;18(4):437-48.

Guzzo J, Guzzo A, DuBow MS. Characterization of the effects of aluminum on luciferase biosensors for the detection of ecotoxicity. *Toxicol Lett.* 1992:687-93.

Hakkila K, Green T, Leskinen P, Ivask A, Marks R, Virta M. Detection of bioavailable heavy metals in EILATox-Oregon samples using whole-cell luminescent bacterial sensors in suspension or immobilized onto fibre-optic tips. *J Appl Toxicol.* 2004;24(5):333-42.

Hakkila K, Maksimow M, Karp M, Virta M. Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Anal Biochem.* 2002;301(2):235-42.

Huckle JW, Morby AP, Turner JS, Robinson NJ. Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol Microbiol.* 1993;7:177-87.

International Chemical Safety Cards (ICSCs). World Health Organization (WHO) [homepage on the Internet]. Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://www.ilo.org/legacy/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/index.htm> [2011 Sept. 12].

Ivask A, Virta M, Kahru A. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil. *Soil Biol Biochem.* 2002;34:1439-47.

Ivask A, Hakkila K, Virta M. Detection of organomercurials with sensor bacteria. *Anal Chem.* 2001;73:5168-71.

- Iwuoha EI, Kane S, Ania CO, Smyth MR, de Montellano PRO, Fuhr U. Reactivities of organic phase biosensors 3: electrochemical study of cytochrome P450. *Electroanalysis*. 2000;12:980-6.
- Ji G, Silver S. Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol*. 1992;174:3684-94.
- Joyner CD, Steven EL. Heterogeneity of iron bioavailability on plants assessed with a whole-cell GFP based bacterial biosensor. *Microbiology*. 2000;146:2435-45.
- Lee SM, Suzuki M, Kumagai M, Ikeda H, Tamiya E, Karube I. Bioluminescence detection system of mutagen using firefly luciferase genes introduced in *Escherichia coli* lysogenic strain. *Anal Chem*. 1992;64(17):1755-9.
- Lee SM, Suzuki M, Tamiya E, Karube I. Microbial detection of toxic compounds utilizing recombinant DNA technology and bioluminescence. *Anal Chim Acta*. 1991;244(2):201-6.
- Li X, Zhang G, Ngo N, Zhao X, Kain SR, Huang CC. Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J Biol Chem*. 1997;272(45):28545-9.
- Liu X, Germaine KJ, Ryan D, Dowling DN. Whole-Cell fluorescent biosensors for bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Sensors*. 2010;10(2):1377-1398.
- Liao VHC, Ou KL. Development and testing of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for measuring bioavailable arsenic in contaminated groundwater samples. *Environ Toxicol Chem*. 2005;24:1627-31.
- Liao VHC, Chien MT, Tseng YY, Ou KL. Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein-based bacterial biosensors. *Environ Pollut*. 2006;142:17-23.
- Magrisso S, Erel Y, Belkin S. Microbial reporters of metal bioavailability. *Microbial Biotech*. 2008;1:320-30
- Magrisso S, Belkin S, Erel Y. Lead bioavailability in soil and soil components. *Water Air Soil Poll*. 2009; 202(1-4):315-323.
- Maier RM, Pepper IL, Gerba C. *Environmental Microbiology*. San Diego: Academic Press, 2000.
- Mergeay M, Monchy S, Vallaeyts T, Auquier V, Benotmane A, Bertin P, Taghavi S, Dunn J, van der Lelie D, Wattiez R. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *Microbiol Rev*. 2003;27(2-3):385-410.
- Monchy S, Vallaeyts T, Bossus A, Mergeay M. Metal transport ATPase genes from *Cupriavidus metallidurans* CH34: a transcriptomic approach. *Int J Environ Anal Chem*. 2006;86(9):677-92.

- Mulchandani A, Bassi AS. Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control. *Crit Rev Biotechnol*. 1995;15:105-24.
- Muniz DHF, Oliveira-Filho EC. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. *Universitas: Ciências da Saúde*. 2006;4:83-100
- Nascimento AMA, Azevedo MO, Astolfi-Filho S, Chartone-Souza E. Cloning of the mercury ion resistance operon of pBH100 *Escherichia coli* 5K using pAT153 as vector. *Revista de Microbiologia*. 1992;23:217-20
- Nascimento AMA, Chartone-Souza E. Operon *mer*: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res*. 2003;2(1):92-101.
- Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;51(6):730-50.
- Omura T, Kiyono M, Pan-Hou H. Development of a specific and sensitive bacteria sensor for detection of mercury at picomolar levels in environment. *J Health Sci*. 2004;50(4):379-83.
- Peitzsch N, Eberz G, Nies HD. *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:453-8.
- Pepi M, Reniero D, Baldi B, Barbieri P. A comparison of *mer::lux* whole cell biosensors and moss, a bioindicator for estimating mercury pollut. *Water Air Soil Pollut*. 2006;173:163-75.
- Petänen T, Romantschuk M. Toxicity and bioavailability to bacteria of particle-associated arsenite and mercury. *Chemosphere*. 2003;50:409-13
- Petänen T, Virta M, Karp M, Romantschuk M. Construction and use of broad host range mercury and arsenite sensor plasmid in the soil bacterium *P. fluorescens* OS8. *Microbiol Ecol*. 2001;41:360-8.
- Piveli R, Kato MT. Qualidade das águas e poluição: aspectos físicos-químicos. ABES. 2005:173-87.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 1992;111(2):229-33.
- Quadros OF. Construção de biossensor bacteriano para detecção de mercúrio [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.
- Ramanathan S, Ensor M and Daunert. Bacterial biosensors for monitoring toxic metals. *TIBTECH*. 1997;15:500-6.
- Ramanathan S, Shi W, Rosen BP, Daunert S. Bacteria-based chemiluminescence sensing system using [beta]-galactosidase under the control of the ArsR regulatory protein of the *ars* operon. *Anal Chim Acta*. 1998;369:189-95.

- Riether KB, Dollard MA, Billard P. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli zntAp::lux* and *copAp::lux*-based biosensors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;57:712-6.
- Roane TM, Pepper IL. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microbiol. Ecol.* 2000;38:358-64
- Roberto F, Barnes FMJ, Bruhn FD. Evaluation of a *gfp* reporter gene construct for environmental arsenic detection. *Talanta.* 2002;58:181-8.
- Rosen BP, Bhattacharjee H, Zhou T, Walmsley AR. Mechanism of the ArsA ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1461:207-15.
- Rossy E, Seneque O, Lascoux D, Lemaire D, Crouzy S, Delangle P, Coves J. Is the cytoplasmic loop of MerT, the mercuric ion transport protein, involved in mercury transfer to the mercuric reductase? *FEBS Lett.* 2004;575(1-3):86-90.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Press; 2001. 3 vol.
- Scott DL, Ramanathan S, Shi W, Rosen BP, Daunert S. Genetically engineered bacteria: electrochemical sensing systems for antimonite and arsenite. *Anal Chem.* 1997;69:16-20.
- Selifonova O, Burlage R, Barkay T. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable mercury (II) in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:3083-90.
- Shetty RS, Deo SK, Shah P, Sun Y, Rosen BP, Daunert S. Luminescence-based whole-cellsensing systems for cadmium and lead using genetically engineered bacteria. *Anal Bioanal Chem.* 2003;376:11-7.
- Shetty RS, Deo KS, Liu Y, Daunert S. Fluorescence-based sensing system for copper using genetically engineered living yeast cells. *Biotechnol Bioeng.* 2002;88:664-70.
- Silver S, Phung LT. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2005;12:1-19.
- Sofia H, Burland V, Daniels D, Plunkett Gr, Blattner F. Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(13):2576-86.
- Stocker J, Balluch D, Gsell M, Harms H, Feliciano J, Daunert S., et al. Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ Sci Technol.* 2003;37:4743-50.
- Taghavi S, Mergeay M, Nies D, van der Lelie D. *Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment. *Res Microbiol.* 1997;148(6):536-51.
- Tauriainen S, Karp M, Chang W, Virta M. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosens Bioelectron.* 1998;13(9):931-8.

Tauriainen S, Karp M, Chang W, Virta M. Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:4456-61.

Tauriainen S, Virta M, Chang W, Lampinen J, Karp M. Measurement of firefly luciferase reporter gene activity from cells and lysates using *Escherichia coli* arsenite and mercury sensors. *Anal Biochem;* 1999;272:191-8.

Tecon R, van der Meer JR. Information from single-cell bacterial biosensors: what is it good for? *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17(1):4-10.

Tibazarwa C, Corbisier P, Mench M, Bossus A, Solda P, Mergeay M, et al. A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environ Pollut.* 2001;113:19-26.

Tom-Petersen A, Hosbond C, Nybroe O. Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001;38:59-67.

Trang PTK, Berg M, Viet PH, Mui NV, Van der Meer JR. Bacterial bioassay for rapid and accurate analysis of arsenic in highly variable groundwater samples. *Environ Sci Technol.* 2005;39:7625-30.

Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:509-44.

Turner APF, Karube Y, Wilson GS. *Biosensors. Fundamentals and Applications.* New York: Oxford University Press; 1987.

Vandamme P, Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:2285-9.

Vieira JLF, Passarelli MM. Determinação de mercúrio total em amostras de água, sedimento e sólidos em suspensão de corpos aquáticos por espectrofotometria de absorção atômica com gerador de vapor a frio. *Rev Saúde Pública,* 1996;30:256-60.

Virta M, Lampinen J, Karp M. A luminescence-based mercury biosensor. *Anal Chem.* 1995;67:667-9.

Ward WW, Cody CW, Hart RC. Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green fluorescent proteins. *Photochem Photobiol Rev.* 1980;31:611-5.

Weitz HJ, Ritchie JM, Bailey DA, Horsburgh AM, Killham K, Glover LA. Construction of a modified mini-Tn5 *luxCDABE* transposon for the development of bacterial biosensors for ecotoxicity testing. *Microbiol Lett.* 2001;197(2):159-65.

Wells M, Gosch M, Rigler R, Harms H, Lasser T, van der Meer JR. Ultrasensitive reporter protein detection in genetically engineered bacteria. *Anal Chem.* 2005;77(9):2683-9.

Welsh S, Kay SA. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Current Biology in Biotechnology*. 1997;8:617-22.

Xu C, Shi W, Rosen B. The chromosomal *arsR* gene of *Escherichia coli* encodes a trans-acting metalloregulatory protein. *J Biol Chem*. 1996;271(5):2427-32.

Yagi K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;73(6):1251-8.

Yoon KP, Misra TK, Silver S. Regulation of the *cadA* cadmium resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol*. 1991;173:7643-9.

Zhang Y, Monchy S, Greenberg B, Mergeay M, Gang O, Taghavi S, et al. ArsR arsenic-resistance regulatory protein from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009;96(2):161-70.

Zhang YZ, Naleway JJ, Larison KD, Huang ZJ, Haugland RP. Detecting *lacZ* gene expression in living cells with new lipophilic, fluorogenic β -galactosidase substrates. *FASEB J*. 1991;5(15):3108-13.