

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

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.

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) dispõe 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).

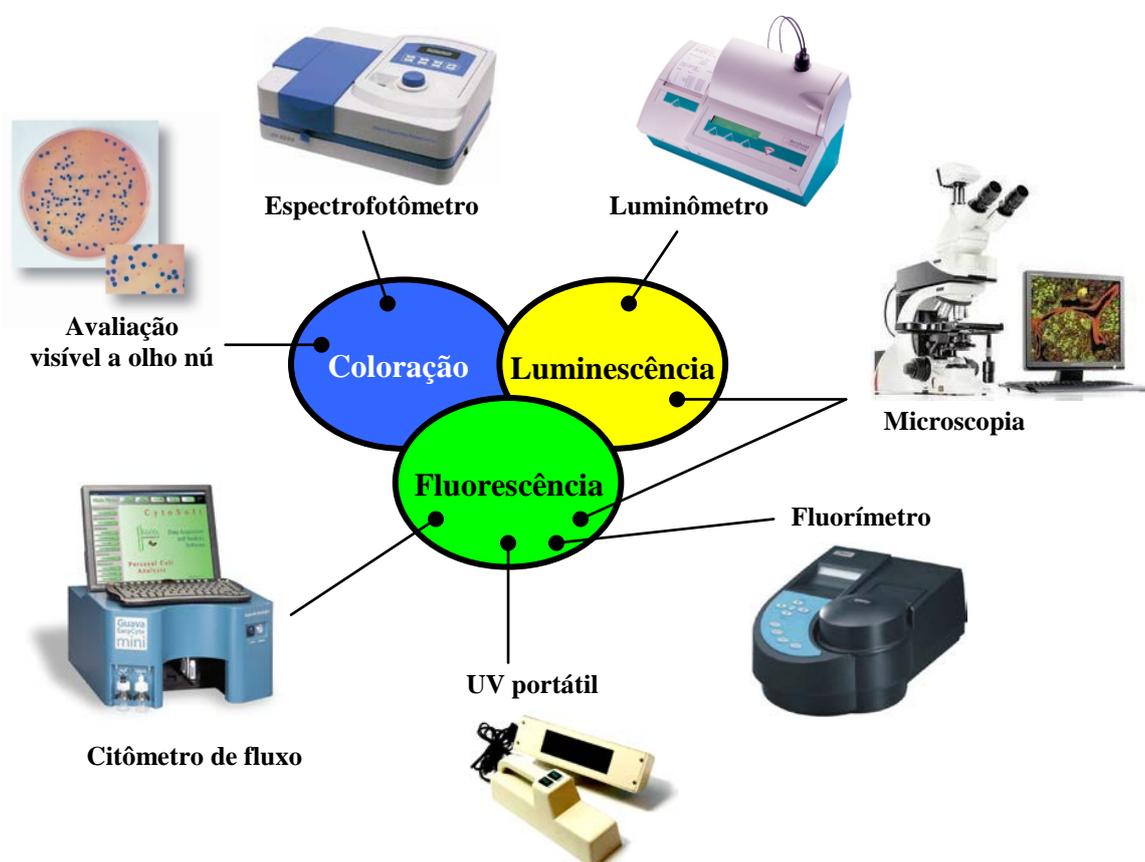


Figura 1 – Diferentes metodologias e equipamentos utilizados na detecção e/ou quantificação de sinais gerados pelos biossensores.

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.

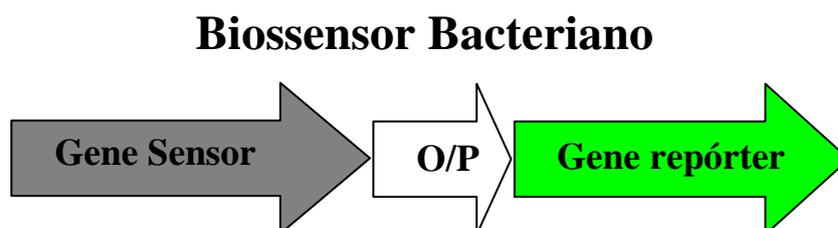


Figura 2 – Esquema da construção de um biossensor bacteriano.

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>lucFF</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>lucFF</i>	<i>E. coli</i>	0,005–10	90 min	Tauriainen et al. (1999)
	As ³⁺			0,033–1		
	As ⁵⁺			33–33000		
	Cd			10–10000		
	Sb			0,1–100		
	As	<i>luxAB (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	0,1–0,8	60 min	Stocker et al. (2003)
	As	<i>luxAB (V. fischeri)</i>	<i>E. coli</i>	0,1–0,4	60 min	Trang et al. (2005)
	As	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>E. coli</i>	0,13–133	12 h	Roberto et al. (2002)
	As	<i>lucGR (P. plagiophthalmus)</i>	<i>P. fluorescens</i>	0,1–10	120 min	Petanen et al. (2001)
Cd	<i>lucFF</i>	<i>S. aureus</i>	0,5–5	120 min	Tauriainen et al. (1997)	
Sb			0,1–10			
As ³⁺	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>E. coli</i>	0,4–25	120 min	Liao e Ou (2005)	
As ⁵⁺			1–50			
Sb			0,75–8			
<i>arsRD</i>	As ³⁺	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	0,5–100	17 h	Scott et al. (1997)
	Sb			0,1–10		
<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>lucF</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	0,003–0,1	180 min	Tauriainen et al. (1998)
	Pb			1–10		
	Sb			0,033–3,3		
	Sn			33–1000		
	Zn	<i>GFP (A. Victoria)</i>	<i>E. coli</i>	1–33	120 min	Liao et al. (2006)
	Cd			0,0001–500		
	Pb			0,01–10		
	Sb			0,0001–10		
<i>chrB</i>	Cr	<i>lacZ</i>	<i>C. metallidurans</i>	0,001–50	8 h	Peitzsch et al. (1998)
<i>chrB</i>	Cr ³⁺	<i>luxCDABE (V. fischeri)</i>	<i>C. metallidurans</i>	5–80	90 min	Corbisier et al. (1999)
	Cr ⁶⁺			2,5–40		
<i>chrAB</i>	Cr ³⁺	<i>lucFF</i>	<i>C. metallidurans</i>	2–100	120 min	Ivask et al. (2002)
	Cr ⁶⁺			0,04–1		
<i>cnrXYH</i>	Co	<i>luxDABE (V. fischeri)</i>	<i>C. metallidurans</i>	9–400	16 h	Tibazarwa et al. (2001)
	Ni			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).

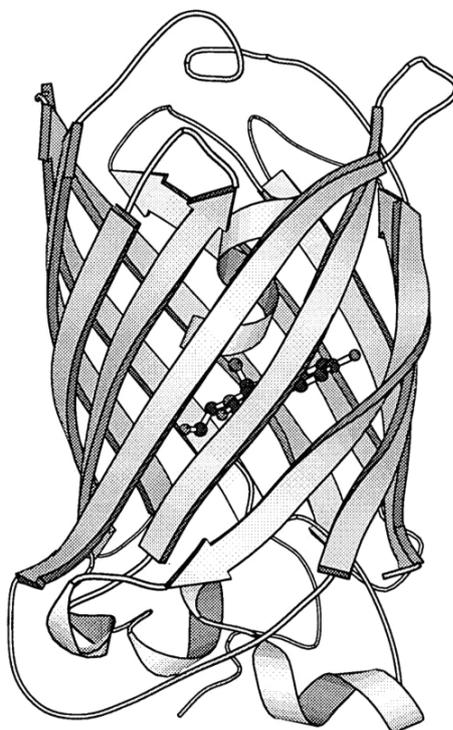


Figura 3 – Representação esquemática da Proteína Verde Fluorescente.
Fonte: Tsien, 1998.

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.

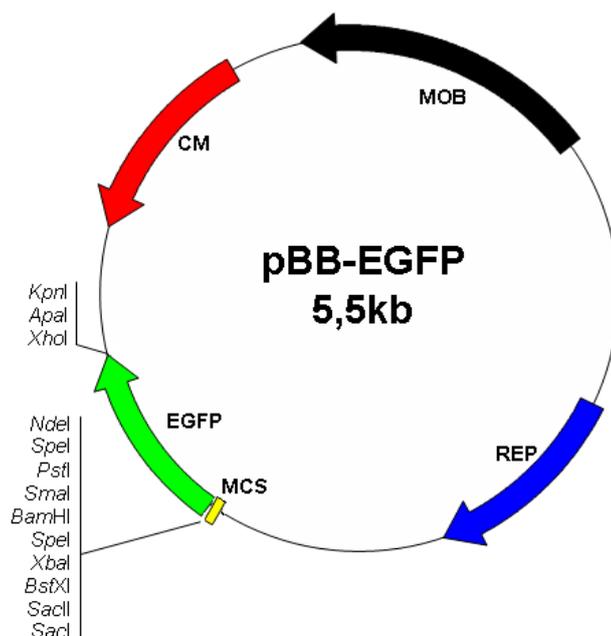


Figura 4 – Esquema do plasmídeo pBB-EGFP.

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*, *Xanthomonas 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).

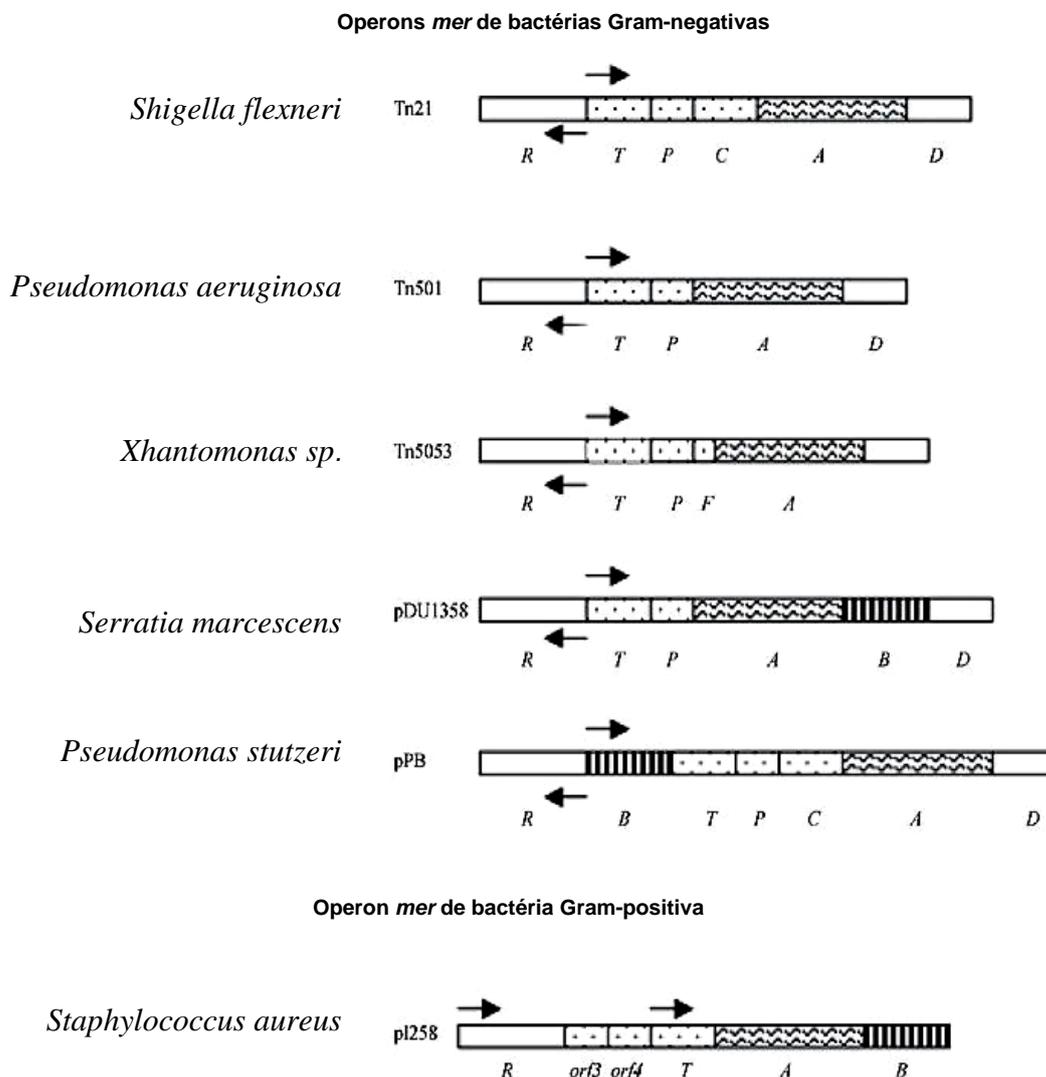


Figura 5 – Representação esquemática de operons *mer* de diferentes bactérias.
 Fonte: Nascimento e Chartone-Souza, 2003.

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).

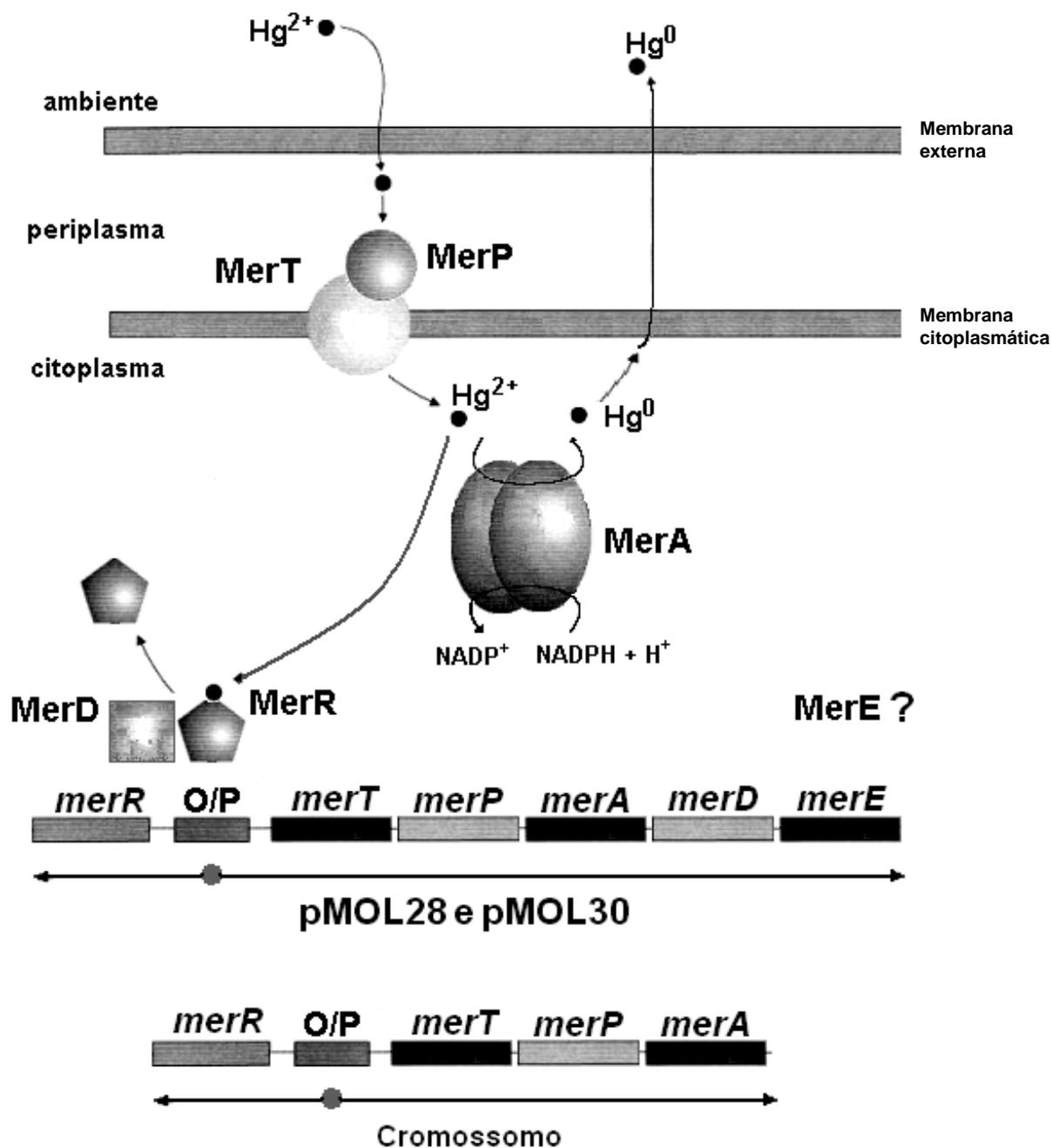


Figura 6 – Representação esquemática do sistema de resistência a Hg^{2+} em *C. metallidurans* CH34. Na parte inferior da figura estão representados os genes do operon *mer* presente nos plasmídeos pMOL28 e pMOL30 e na região cromossomal. As flechas indicam o sentido de transcrição dos genes. Na parte 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).

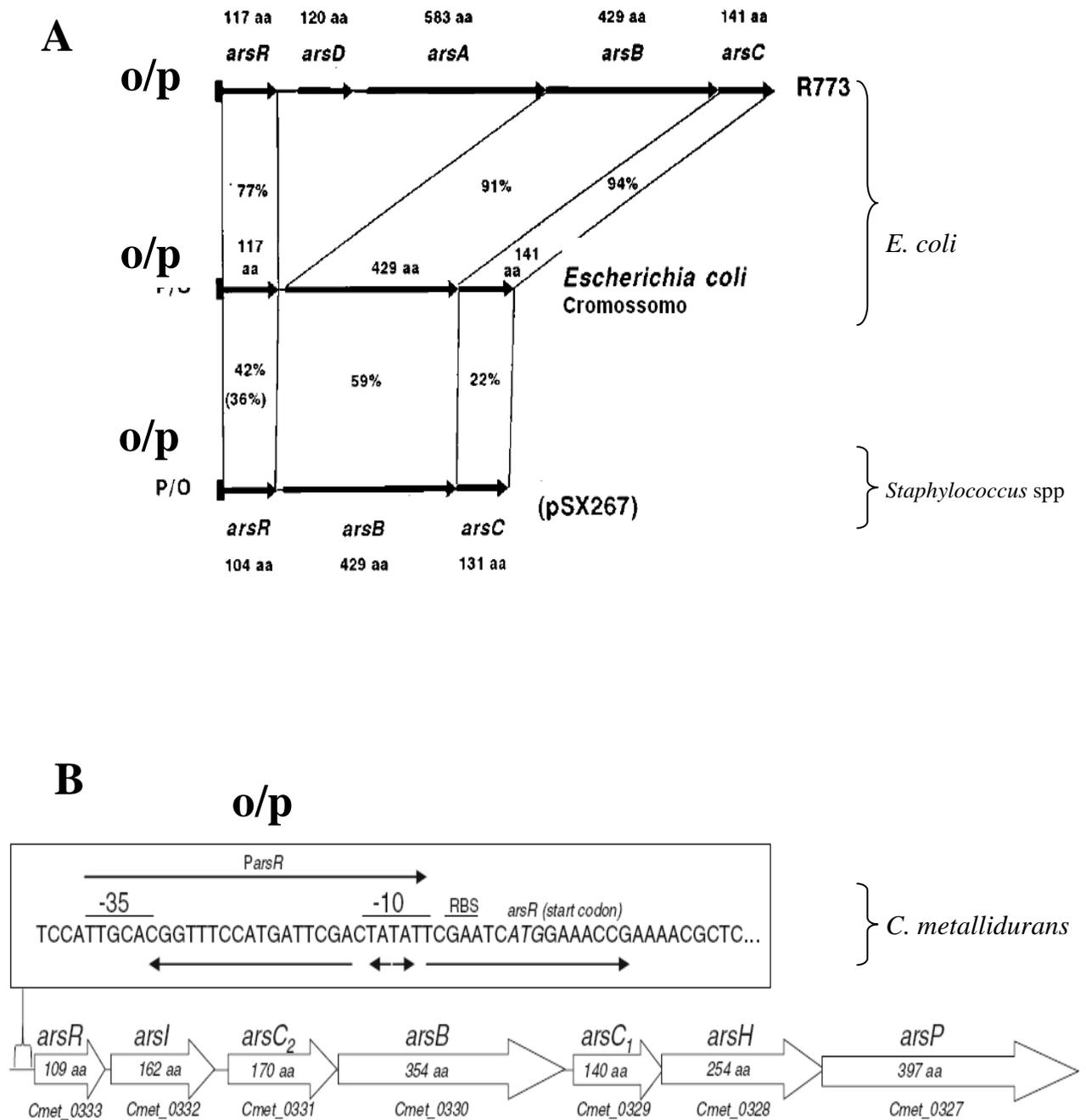


Figura 7 – Esquema da organização do operons *ars* de: A) *E. coli*: plasmídeo R773 e cromossômico de *E. coli* K12 e do plasmídeo pI258 de *Staphylococcus* spp.; B) Operon *ars* do cromossomo 1 de *C. metallidurans* CH34.

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*

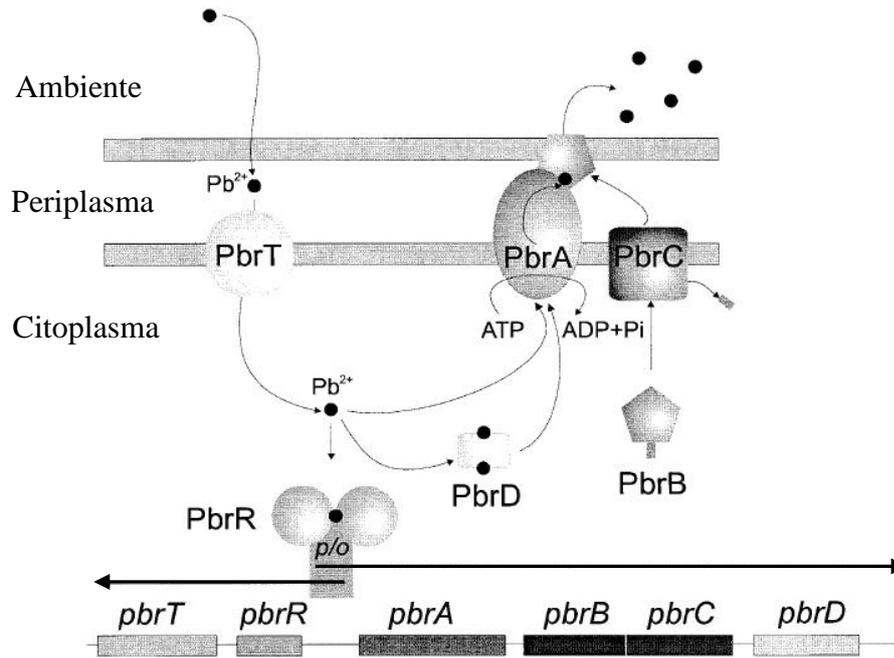
Os autores Borremans et al. (2001) descreveram o primeiro mecanismo específico de resistência aos íons Pb^{2+} em bactérias. Esse mecanismo, descoberto em *C. metallidurans* CH34, é codificado pelo operon *pbr* e combina as funções envolvidas na captura, efluxo e acúmulo de íons Pb^{2+} (Figura 8A).

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.

A)



B)

Início
pbrA
CAT

Operador / promotor mer

GCCACATCCCTTCGAGCCACATTTCGCTCATGGCAACCCCTTGTGTGTAATTCATCTCGCGTTGCCGATTTA
 ACACCCTCTAGTTACTATAGAGTCAAGACATCTCCCATCCGACGCCATGAAATATCCAGATCGGGCAGCTT

Início
pbrR
ATG

GCCAAGCGCACCCGCATGCCCGGTGGTGACCATTTCGCTTCTACGAACAAGAAGGGCTGTTGCCGCGCCGCGG
 GCCGCAGCCGGGGAAATTTTCGCCTGTATGGCAGGAGCACGTGGAGCGCTTGCAGTTCATTTCGTCACCTG
 CCGGTCTCTGGATATGCGTGTGAGCGACGTACGGACCTTATTGAGTTACCGGAAAGCGGCCCGACCAGGAT
 TGCGGTGAAGTCAAATATGCTCTTGGATGAGCACATCCGTCAGGTCGAATCTCGGATCGGAGCTTTGCTCG
 AACTGAAAGCACCATTTGGTGGAAGCTGCGCGAAGCCTGTTCTGGTGCCAGGCCCGCCC AATCGTGCGGGAT
 TCTGCAGGGACTGTCGGACTGCGTGTGTGATACGCGGGGACCACCGCCATCCAAGCGAC TAGGTGGGC

Fim
pbrR
TAG

ATCCCTGGCGCCGTA CTTCGCTCCTGCATTTGGATAGTGGCATCGTGCCGGCAAATAGAAATTACAATCA
 TTCGCATTTGTACGCGAAATCGCTGTTCTGCCGGTAAGGCCTCCC ATGCAAAGCCCTGCGTCTCC TTTTGA

Início
pbrT
ATG

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).

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 oligonucleotídeos 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, Levcov 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-cell sensing 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.