

**OCORRÊNCIA DE PLASMÍDIOS EM BACTÉRIAS RESISTENTES  
A METAIS PESADOS, ISOLADAS DE SOLOS CONTAMINADOS  
PELAS ATIVIDADES DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA  
NO ESTADO DA PARAÍBA**

Henrique Douglas Melo Coutinho

Teresa Cristina Soares de Lima

Breno Machado Grisi

Hilzeth de Luna Freire Pessôa<sup>1</sup>

*Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia (LABIME), Departamento de Biologia Molecular, CCEN, Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa, PB, Brasil*

**ABSTRACT**

***Occurrence of plasmids in bacteria strains resistant to heavy metals isolated from soils contaminated by sugar-cane industrial activities in Paraíba State.*** Soil bacteria have important role on nutrients cycling, being a great reservoir pool, mainly in tropical soils. These microorganisms change genetic information, by transformation, transduction and mainly conjugation processes, where in the latter, plasmids of several sizes have been observed, carrying resistance determinants to antibiotics, heavy metals and several organic compounds. In the present work, bacterial soil strains isolated from sugar cane factory environments, able to grow in medium with different and specific carbon sources, amended with different heavy metals concentrations. The resistant bacterial soil strains that have presented plasmids were investigated, and it was also observed if such plasmids would be induced by selective agents. Two of the techniques for DNA extractions, allowed to obtain satisfactory plasmidial profiles, being possible a comparative analysis of these techniques. Eleven strains presented plasmids, among the 24 strains tested.

**Keywords:** Soil bacterial communities, plasmids, heavy metals, antibiotics, DNA extraction.

**Descritores:** Comunidades bacterianas de solo, plasmídios, metais pesados, antibióticos, extração de DNA.

**INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, os metais, em particular os metais pesados, têm recebido muita atenção devido a sua liberação e persistência no meio ambiente, assim como a sua toxicidade para uma grande variedade de organismos. Os metais pesados compreendem 40 elementos com uma densidade igual ou maior a 5 g/cm<sup>3</sup>. Muitos desses metais são essenciais para o desenvolvimento de organismos procarióticos e eucarióticos, como elementos-traços, em

---

<sup>1</sup>Autor para correspondência.

concentrações da ordem de nanomolar; entretanto, ao nível de micro ou milimolar eles são tóxicos (TREVORS *et al.*, 1986; SIQUEIRA *et al.*, 1994). Os metais pesados são utilizados em países industrializados para uma série de aplicações. A sua extensiva utilização leva à contaminação dos habitats aquáticos e terrestres, principalmente com cátions divalentes. Além da contaminação de origem antrópica, os íons de metais pesados podem ser carreados de minerais que ocorrem na Natureza. Em ambos os casos, em geral, não é apenas um cátion que está presente em concentrações tóxicas e sim um cátion principal e mais alguns íons que o acompanham, como por exemplo,  $Zn^{2+}$  mais  $Cd^{2+}$ ;  $Ni^{2+}$  mais  $Co^{2+}$  e  $CrO_4^{2-}$  (NIES, 1992), podendo então ter um efeito sinérgico sobre os organismos.

A toxicidade dos metais pesados para os organismos vivos é afetada por um amplo espectro de fatores bióticos e abióticos. Para que um íon metálico possa ser absorvido por uma célula viva deve-se considerar uma série de parâmetros químicos, tais como: carga do metal, seu raio iônico, preferência por determinados ligantes orgânicos, concentração disponível em ambientes poluídos e não poluídos, reações químicas dos íons em solução, capacidade de absorção do metal e a existência de bombas de efluxo no organismo em questão. Além disso, deve-se considerar também a solubilidade, o pH, a temperatura, o potencial de oxidação-redução, a presença de íons competidores, quelantes e ligações não específicas a proteínas, argila e matéria orgânica (TREVORS *et al.*, 1986). Na Natureza ocorrem bactérias que apresentam múltipla resistência a íons metálicos (SIQUEIRA *et al.*, 1994), especialmente em ambientes poluídos. Muitas linhagens bacterianas contêm determinantes genéticos para resistência a metais pesados, tais como:  $Hg^{2+}$ , organomercúricos,  $Ag^+$ ,  $AsO^-$ ,  $AsO_4^{3-}$ ,  $Bi^{3+}$ ,  $BO_3^{3-}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $CrO_4^{2-}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{3+}$ ,  $Sb^{2+}$ ,  $TeO_3^{2-}$ ,  $Tl^+$ ,  $Zn^{2+}$  e certamente muitos outros (SILVER e MISRA, 1988). Essa resistência pode estar associada a determinantes genéticos contidos em plasmídios, como descrito para *Staphylococcus aureus* e para a bactéria de solo *Alcaligenes eutrophus* linhagem CH34 (FOSTER, 1987) ou em elementos genéticos transponíveis (RADFORD *et al.*, 1981; NIES, 1992).

Um grande número de plasmídios são conhecidos e foram isolados aproximadamente 300 tipos diferentes que ocorrem, de forma natural, em linhagens de *Escherichia coli*. Embora os plasmídios não carreguem genes essenciais para a bactéria hospedeira, sob todas as condições de crescimento, a sua presença pode ter uma profunda influência no fenótipo da célula. Dentre os mais disseminados e mais bem estudados grupos de plasmídios estão os plasmídios de resistência (plasmídios R), que conferem resistência a antibióticos e vários outros inibidores de crescimento. Um plasmídio R pode conter vários genes de resistência a antibióticos e, em geral, esses genes codificam proteínas que inativam o antibiótico ou afetam a sua entrada na célula.

Vários plasmídios isolados de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas codificam para resistência aos efeitos dos metais pesados. Determinados plasmídios de resistência a antibióticos também possuem genes para resistência

a mercúrio e arsênico. Outros plasmídios codificam apenas para resistência a metais pesados. Foi isolado de *Staphylococcus aureus* um grande plasmídio que codifica para resistência a mercúrio, cádmio, arsenato e arsenito. O mecanismo de resistência aos diversos metais pesados é variável. Estudos feitos em bactérias resistentes a níquel e cobalto mostraram que, na maioria dos casos, os genes de resistência estão em apenas um plasmídio (BROCK *et al.*, 1994).

A resistência aos metais  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  pode ocorrer com base em dois mecanismos: a complexação do metal a fatores de ligação produzidos pela célula e/ou o efluxo ativo de cátions (SILVER *et al.*, 1989). A resistência ao  $Hg^{2+}$  é devida a sua reciclagem enzimática até  $Hg^0$ , que se volatiliza para fora das células (WALSH *et al.*, 1988). Em geral, os procariontes evitam o acúmulo desses metais pelo efluxo ativo de cátions e os eucariontes produzem fatores de ligação. Na maioria dos animais e nos eucariontes inferiores, os fatores de ligação se constituem de pequenas proteínas, ricas em cisteína, denominadas metalotioneínas. As plantas produzem um outro polipeptídio, também rico em cisteína, denominado fitoquelatina. Por outro lado, apesar de serem mais comuns em eucariotes, foram descritas metalotioneínas em *Pseudomonas* e em uma cianobactéria do gênero *Synechococcus*, podendo os fatores de ligação funcionarem como uma segunda linha de defesa em bactérias, tendo o efluxo de cátions como o principal sistema de resistência (HIGHAN *et al.*, 1984). Em *Saccharomyces cerevisiae* ocorre resistência ao  $Cd^{2+}$  e ao  $Zn^{2+}$ , associada com uma suposta proteína ligada à membrana (ZRC-1), que pode estar envolvida no efluxo de cátions (KAMIZONO *et al.*, 1989).

A contaminação dos solos com metais pesados tornou-se um problema muito sério para a sua própria produtividade (SIQUEIRA *et al.*, 1994), sendo necessário o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a sua desintoxicação. Uma das mais estudadas é a biorremediação.

A biorremediação consiste no uso de microrganismos no tratamento de ambientes contaminados com resíduos, sejam eles metais ou outros poluentes (SHANNON e UNTERMAN, 1993). Essa ação microbiológica é um importante fator na amenização dos efeitos da contaminação ambiental que age sobre os organismos no ecossistema e podem causar doenças ao homem (JAIN e SAYLER, 1987). Existem cinco técnicas empregadas na biorremediação: a) biodegradação de compostos orgânicos: -destruição da estrutura central do composto original, criando metabólitos menos complexos, de menor massa e menos tóxicos (DON e PEMBERTON, 1981; JAIN e SAYLER, 1987; SAID e LEWIS, 1991; SPRINGAEL *et al.*, 1993; BHAT *et al.*, 1994; NADEAU *et al.*, 1994; QUENTMEIER e FRIEDRICH, 1994; STIEBER *et al.*, 1994); b) humificação e polimerização: -imobilização do composto pela sua polimerização ou por processo de incorporação ao húmus; c) transformações abióticas: -alteração abiótica da estrutura do composto, tornando-o disponível ao ataque microbiano; d) biotransformação de metais ou compostos metálicos: -retirada do metal do meio devido a sua redução ou oxidação (FOSTER, 1987; HORN *et al.*, 1994; KIYONO *et al.*, 1995); e) estabilização/ acumulação biologicamente mediada:

-componentes bióticos são utilizados para seqüestrar os compostos de forma intacta (SHANNON e UNTERMAN, 1993).

Atualmente já se estuda a possibilidade de se utilizar bactérias biotransformadoras que, através de alterações nas características do elemento, favorecem sua retirada do meio. São exemplos disso as bactérias capazes de reduzir o U [U (VI)] para sua forma precipitada U (IV), que é insolúvel em meio aquoso, diminuindo assim a sua toxicidade no ambiente (SHANNON e UNTERMAN, 1993).

Existem ainda casos como o do cromato, cujo uso industrial tem levado à contaminação de ambientes aquáticos com a sua forma mais tóxica, o Cr (VI). A utilização de bactérias capazes de reduzir o Cr (VI), altamente tóxico (que ao associar-se com o O<sub>2</sub> pode gerar poderosos oxidantes), para o Cr (III), insolúvel em água, tem sido estudada como uma forma extremamente viável de descontaminação desses ambientes (CERVANTES e SILVER, 1992; SHANNON e UNTERMAN, *op. cit.*). Muitas espécies de bactérias foram estudadas por apresentarem essa capacidade de redução enzimática, tais como *Pseudomonas fluorescens* LB300 (BOPP e EHRlich, 1988), *Pseudomonas aeruginosa* (CERVANTES *et al.*, 1990) e *Escherichia coli*, além de outras espécies pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, entre outras (CERVANTES e SILVER, *op. cit.*).

Muitos metais, como As, Se e Hg, tornam-se altamente voláteis quando metilados ou transformados em sua forma metálica, sendo também uma alternativa para uma desintoxicação do ambiente (HORN *et al.*, 1994).

O objetivo deste trabalho consistiu em evidenciar a presença de plasmídios em isolados bacterianos de solo da agroindústria canavieira do estado da Paraíba, que apresentavam crescimento nas concentrações dos metais Zn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> e Hg<sup>+2</sup> testadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### LINHAGENS UTILIZADAS

As seguintes linhagens foram utilizadas: *Escherichia coli* C600 (SAMBROOK *et al.*, 1989); *Escherichia coli* J53 pUR400 (SCHMID *et al.*, 1982); *Escherichia coli* EC206 (NIES *et al.*, 1989), além de 82 isolados bacterianos, oriundos de solos poluídos com restos de cultivo e/ou resíduos da agroindústria sucroalcooleira, que foram testados quanto à sua tolerância a metais pesados e antibióticos (Tab. 1) (LIMA *et al.*, 1994; COUTINHO *et al.*, 1995). Os isolados foram caracterizados fenotipicamente através de testes bioquímicos, de acordo com os parâmetros descritos em SNEATH *et al.* (1986) e HOLT *et al.* (1994). A sobrevivência dos isolados, frente aos antibióticos ampicilina (50 µg/ml), estreptomicina (20 µg/ml), kanamicina (20 µg/ml), ácido nalidixico (20 µg/ml) e tetraciclina (10 µg/ml), foi testada em meio NB ágar (LIMA *et al.*, 1994).

TABELA 1 – Linhagens selecionadas para a extração de DNA.

Linhagem	Espécie	Temp. (°C)	Marcas
AS5	<i>Enterobacter cloacae</i>	30	Cd <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Amp
AS13A	<i>Sporosarcina ureae</i>	30	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Nal
AS14	<i>Pseudomonas pickettii</i>	37	Co <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp, Sm, Nal
AS15	<i>Pseudomonas delafieldii</i>	30	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp
AS16	<i>Serratia marcescens</i>	30	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp
AS16A	<i>Pseudomonas cepacia</i>	30	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Km, Amp, Sm
AS18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp, Sm, Nal
AS18A	<i>Pseudomonas cepacia</i>	37	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp, Sm, Nal
AS20A	<i>Pseudomonas pickettii</i>	37	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp, Sm
AS20B	<i>Pseudomonas pickettii</i>	37	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp, Sm
AS23	<i>Serratia marcescens</i>	30	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Tc, Amp
AS26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Km, Amp, Sm
AS29A	<i>Citrobacter freundii</i>	30	Cd <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Km, Amp
AS31	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	37	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp, Sm
AS40	<i>Serratia marcescens</i>	30	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp, Sm
AS42A	<i>Serratia rubidaea</i>	37	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Amp
AS43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp, Sm, Nal
AS43A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Km, Amp, Sm, Nal
AS44	<i>Proteus vulgaris</i>	30	Cu <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Km, Amp, Sm
AS46A	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	30	Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Amp, Sm
AS46B	<i>Pseudomonas cepacia</i>	30	Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Km, Tc, Amp
AS47A	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	37	Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Amp
AS48	<i>Kurthia gibsonii</i>	37	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Nal
AS50	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	30	Cd <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Km, Amp, Sm

## CRESCIMENTO EM MEIO M9-TRIS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Os isolados foram testados em Meio M9-Tris contendo 1,5% de ágar e 1/5 do volume final da solução de sais para M9-Tris (5X) esterilizada (27,8 g de Tris; 7,45 g de KCl; 2,5 g de NaCl; 5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 0,23 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  para 1 litro), com 2% de glicose ou sacarose, para determinação da fonte de carbono preferencial para cada isolado.

## TESTE DE RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS (MERGEAY *ET AL.*, 1985)

Em Meio M9-Tris, ágar já contendo a fonte de carbono preferencial, foram adicionadas as seguintes concentrações de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5; 0,8; 1,5 e 2,5 mM);  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM);  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mM);  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mM) e  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mM). Em meio NB (0,8% de nutrient broth + 1,5% de ágar), acrescido de 0,2% de glicose ou sacarose, foi testado o crescimento em mercúrio, adicionando-se  $\text{HgCl}_2$  (0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mM).

## EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO

Dentre todos os métodos testados (LEMONS, 1980; KADO e LIU, 1981; GRIMBERG *et al.*, 1989; SAMBROOK *et al.*, 1989 e XIANG *et al.*, 1994), apenas o proposto por KADO e LIU (1981) e por SAMBROOK *et al.* (1989), posteriormente modificado, apresentaram resultados satisfatórios.

## MÉTODO DE KADO E LIU (1981)

As linhagens crescidas durante a noite em NB (30 ou 37 °C), na ausência de metais ou antibióticos, foram centrifugadas (12.000 rpm) e o precipitado foi ressuspenso em 1 ml de tampão E (40 mM de tris-acetato pH 7,9, ajustado com ácido acético glacial; 2 mM de EDTA). Foram adicionados 2 ml do tampão de lise (3% SDS; 50 mM Tris pH 12,6, ajustado com NaOH 2N) e agitado suavemente. O tubo foi incubado por 20 minutos entre 50 e 65 °C, sendo logo após adicionados 2V de fenol:clorofórmio (1:1) não saturado. O tubo foi agitado suavemente, a fase superior foi transferida para outro tubo e submetida a eletroforese.

## MÉTODO DE SAMBROOK *ET AL.* (1989), MODIFICADO

As linhagens que sofriam o processo de extração de DNA foram cultivadas em NB durante a noite na sua temperatura específica de isolamento (30 ou 37 °C). Após esse período, foram centrifugados 3 ml da cultura (12.000 rpm). O precipitado foi ressuspenso em 100  $\mu\text{l}$  da Solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0;

25 mM de EDTA pH 8,0 e 50 mM de glicose), misturado levemente e incubado no gelo por 15 minutos. Adicionaram-se 200 µl da Solução II (0,2 N de NaOH e 1% de SDS) e a mistura foi colocada a 0 °C por 5 minutos, seguido da adição de 150 µl da Solução III (2,55 M de KAc) e incubada em gelo por 30 minutos. Logo após uma centrifugação (12.000 rpm), o sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde acrescentaram-se 2V de ETOOH, permanecendo a -20 °C por 15 minutos. Após centrifugação por 5 minutos, o precipitado foi ressuspenso em 100 µl de Solução 3, constituída de 1 ml de NaAc 0,1M, 0,15 ml de SDS 0,1% e 28,25 ml de TE (25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0). Adicionou-se, então, igual volume de fenol pH 8,0, misturando-se por 2 minutos e centrifugando-se por 3 minutos. A fase aquosa foi retirada e a amostra submetida a novo tratamento com fenol pH 8,0 ou clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Repetiu-se a precipitação com ETOOH e ressuspendeu-se o precipitado em 50 µl de água milli-Q.

#### ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 0,5% PARA DNA TOTAL (SAMBROOK *ET AL.*, 1989; QUENTMEIER E FRIEDRICH, 1994)

O método padrão utilizado para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA é a eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK *et al.*, 1989). Todas as eletroforeses foram feitas em géis horizontais submersos com 12,4 cm x 16,5 cm, na concentração de 0,5%. O tampão de eletroforese utilizado foi o tampão TBE 0,5X (5,4 g de tris base; 2,75 g de ácido bórico e 2 ml de EDTA pH 8,0 para 1 litro). As corridas foram realizadas sob corrente contínua inicial de 40 V por uma hora, sendo depois aumentada para 60 V por 5 horas. O DNA contido no gel foi visualizado com a ajuda do corante fluorescente, brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/ml, sob luz ultravioleta. O padrão de migração eletroforética foi o DNA de *E. coli* J53 abrigando o plasmídeo pUR400, com cerca de 80 kb, para determinar a faixa de migração do DNA plasmidiano e cromossômico. Após a corrida, o gel foi então fotografado.

#### REGISTRO FOTOGRÁFICO DOS GÉIS DE AGAROSE

Os géis de agarose, após a corrida eletroforética e visualização sob UV, foram fotografados com o auxílio de uma câmera Olympus OM 2N 50 mm, montada com filtro laranja HOYA O (G) 49 mm, utilizando o filme Tri - X Pan 400. A câmera foi regulada manualmente, com abertura 5,6 e o tempo de exposição do filme variou entre 30 e 40 segundos. A revelação do filme foi feita com revelador Kodak D-76 durante 4 minutos, interrompido com água e a fixação das imagens foi feita com o auxílio do fixador Kodak por 5 minutos. Após isso, o filme foi deixado em água corrente para ser lavado durante no mínimo 15 minutos. Logo depois, o filme foi levado a um ampliador Ampligraf, onde foi feita a foto em papel Kodabrome Print RC. O papel, depois de exposto,

foi lavado no revelador Dektol Kodak, depois rapidamente numa solução de água:ácido acético (1:1) para interromper a revelação e as imagens foram fixadas com fixador Kodak.

## RESULTADOS

Foram testados 82 isolados quanto ao crescimento em meio M9-Tris, ágar acrescido de uma fonte de carbono, glicose ou sacarose. Todos cresceram no meio utilizado e 50 deles cresceram, preferencialmente, em sacarose.

Os 82 isolados bacterianos foram então testados em meio acrescido de metal pesado na presença da fonte de carbono preferencial. A capacidade de crescimento nos meios com metais pesados possibilita a determinação de algumas concentrações com as quais possam ser discriminados os isolados resistentes (FOSTER *et al.*, 1979). Essas concentrações foram: 3,0 mM para o  $Cd^{2+}$ ; 2,5 mM para  $Zn^{2+}$ ; 1,0 mM para  $Ni^{2+}$ ; 3,0 mM para  $Cu^{2+}$ ; 5,0 mM para  $Co^{2+}$  e 1,0 mM para  $Hg^{2+}$ . Observou-se que: 11 dos isolados testados são resistentes ao  $Cu^{2+}$ ; 6 ao  $Zn^{2+}$ ; 4 ao  $Cd^{2+}$ ; 4 ao  $Ni^{2+}$ ; 2 ao  $Co^{2+}$  e 1 ao  $Hg^{2+}$ .

Foram escolhidos 24 isolados, de diversas espécies, que apresentaram crescimento em diferentes metais em concentrações médias (COUTINHO *et al.*, 1995), associadas à resistência a antibióticos, pois os plasmídios que possuem determinantes de resistência a metais, geralmente, também carregam determinantes de resistência a antibióticos (SCHMIDT e SCHLEGEL, 1994). Além desses isolados, utilizou-se também a linhagem de *Escherichia coli* EC206, que alberga o plasmídio pDNA206, fusão do pVK102 com o fragmento contendo o determinante de resistência ao  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$  (NIES *et al.*, 1989), como padrão de resistência e peso molecular, para se proceder à extração de DNA plasmidiano (Tab. 1).

Utilizando-se a técnica descrita em KADO e LIU (1981), observou-se a presença de DNA plasmidiano em apenas 4 linhagens, quando estas foram cultivadas sem nenhum agente seletivo. As linhagens AS14, AS20A e AS20B possuem um plasmídio grande, cada um, visualizado acima do DNA cromossômico, e a AS16A apresenta três plasmídios, um grande, visualizado acima do DNA cromossômico, e dois pequenos, que migram abaixo do DNA cromossômico (Fig. 1).

Foram utilizadas 2 linhagens-padrão e 3 linhagens, representadas por isolados de solo, para investigar a possível seleção de diferentes plasmídios utilizando-se diferentes agentes seletivos, metal pesado e/ou antibiótico. O DNA plasmidiano foi obtido pela técnica de SAMBROOK *et al.* (1989), modificada. Observou-se que a AS16A apresenta plasmídios diferentes, de acordo com o agente seletivo utilizado para o seu crescimento. A AS46A apresenta o mesmo plasmídio tanto na presença de antibiótico quanto de metal, além de outros plasmídios específicos para cada um dos agentes utilizados. Já na AS44, a presença de plasmídio foi detectada quando a célula foi incubada apenas com antibiótico (Fig. 2).



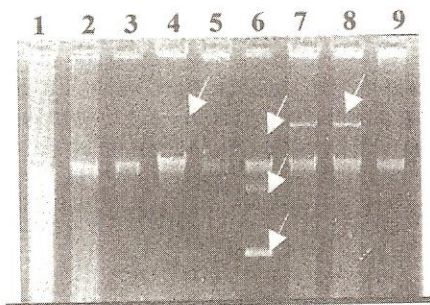


FIGURA 1 – Eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídio 0,5µg/ml. Extração de DNA segundo método descrito em KADO & LIU (1981). 1) *E. coli* C600 (padrão cromossômico); 2) AS10; 3) AS11; 4) AS14; 5) AS16; 6) AS16A; 7) AS20A; 8) AS20B; 9) AS31.

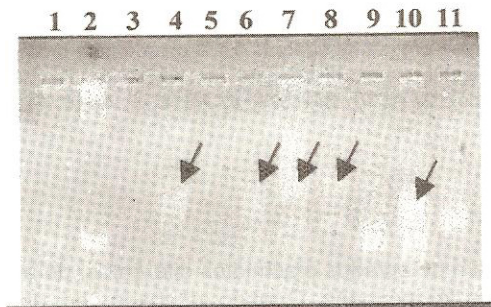
Na AS50 foram detectados plasmídios diferentes, de acordo com o agente seletivo na qual ela foi incubada. Quando incubada com antibiótico, visualizou-se um plasmídio grande, localizado em uma banda acima do DNA cromossômico. Na incubação com metal, visualizou-se um plasmídio localizado abaixo do DNA cromossômico (Fig. 3).

Após a extração de DNA das 24 linhagens de solo e de duas linhagens-padrão, utilizando-se da técnica de SAMBROOK *et al.* (1989), modificada, tendo estas sido cultivadas em meio contendo apenas antibiótico, observou-se o aparecimento de plasmídios nas seguintes linhagens: AS20B, AS23, AS29A, AS40, AS42A e EC206 (Figs. 4 e 5).

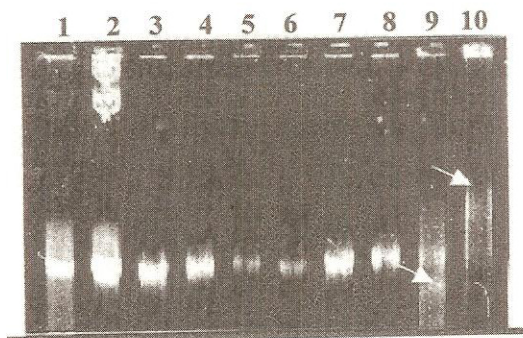
## DISCUSSÃO

Os dados da Tab. 1 mostraram a presença de várias comunidades diferentes nos locais de coleta, e uma característica de comunidades bacterianas que vivem em ambientes degradados ou poluídos é a presença de plasmídios conjugativos com largo espectro de hospedeiros, que possibilitam a transferência da informação entre diferentes grupos bacterianos (CERVANTES

*et al.*, 1990; KRUSE e SØRUM, 1994; TOP *et al.*, 1994). Existe, portanto, a possibilidade de recombinação e alteração desses plasmídios, durante esse processo de transferência da informação genética (COSTA, 1987). Além disso, a presença de diferentes grupos de bactérias em um mesmo ambiente permite e facilita a ocorrência dos outros mecanismos naturais de recombinação, tanto a transformação quanto a transdução (TREVORS *et al.*, 1987; MAZODIER e DAVIES, 1991). Considerando que os determinantes de resistência podem apresentar-se tanto em plasmídios, quanto no cromossomo ou em transposons (existem determinantes onde ocorre uma interação entre produtos plasmidiano e cromossômicos), a capacidade de transmissão genética neste ambiente é muito grande.



**FIGURA 2** – Eletroforese em gel de agarose 0,5% na presença de brometo de etídio 0,5µg/ml. Extração de DNA segundo a técnica de SAMBROOK *et al.* (1989), modificada, com o crescimento da cultura em meios seletivos. 1) *E coli* C600 (NB, padrão cromossômico); 2) *E. coli* J53 pUR 400 (NB, padrão plasmidiano); 3) AS44 (MM9-Tris, Co<sup>2+</sup>, 1 ON\*); 4) AS16A (MM9-Tris, Co<sup>2+</sup>, 2 ON\*\*); 5) AS44 (MM9-Tris, Co<sup>2+</sup>, 2 ON\*\*); 6) AS46A (MM9-Tris, Co<sup>2+</sup>, 2 ON\*\*); 7) AS16A (MM9-Tris, Co<sup>2+</sup>, 1 ON\*); 8) AS46A (MM9-Tris, Co<sup>2+</sup>, 1 ON\*); 9) AS16A (NB, Km, 1 ON\*); 10) AS44 (NB, Km, 1 ON\*); 11) AS46A (NB, Ap, 1 ON\*). (\* - crescida durante 16 horas; \*\* - crescida durante 36 horas).

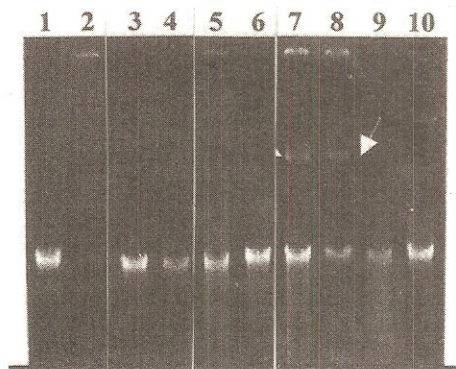


**FIGURA 3** – Eletroforese em gel de agarose 0,5% na presença de brometo de etídio 0,5 $\mu$ g/ml. Extração de DNA segundo SAMBROOK *et al.* (1989), modificado. 1) *E coli* C600 (NB, padrão cromossômico); 2) *E. coli* J53 pUR 400 (NB, padrão plasmidiano); 3) AS14 (NB, Co<sup>2+</sup>, 1 ON\*); 4) AS14 (NB, Tc, 1 ON\*); 5) AS18 (NB, Co<sup>2+</sup>, 1 ON\*); 6) AS18 (NB, Tc, 1 ON\*); 7) AS18A (NB, Co<sup>2+</sup>, 1 ON\*); 8) AS18A (NB, Tc, 1 ON\*); 9) AS50 (NB, Co<sup>2+</sup>, 1 ON\*); 10) AS50 (NB, Ap, 1 ON\*). (\* - crescida durante 16 horas).

Observou-se um crescimento na faixa testada com Zn<sup>2+</sup> (0,5-2,5 mM) de 18 isolados (22,5%), similar à encontrada na literatura, de 0,5 a 2,5 mM (NIES *et al.*, 1987, 1989; SPRINGAEL *et al.*, 1993; TOP *et al.*, 1994; STOPPEL e SCHLEGEL, 1995). Nos testes com Co<sup>2+</sup>, foi observado um crescimento de 59 linhagens (71,9%) na faixa testada (0,1-5,0 mM). Essa faixa abrange um espectro de concentrações similar ao relatado em grande parte da literatura, que variam entre 1,0 e 5,0 mM (NIES *et al.*, 1987, 1989; COLLARD *et al.*, 1993; STOPPEL e SCHLEGEL, 1995), porém inferior a outras, de 0,1 a 20 mM, segundo MERGEAY *et al.* (1985) e SPRINGAEL *et al.* (1993). No caso do Cd<sup>2+</sup>,

9 isolados (11,1%) apresentaram crescimento na faixa de teste (0,5-3,0 mM), que é superior à encontrada na literatura (0,1-1,0 mM) (NIES *et al.*, 1987, 1989; SPRINGAEL *et al.*, 1993). Nas linhagens testadas em  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Co^{2+}$ , foram consideradas resistentes, 6, 4 e 2 isolados, respectivamente.

No presente trabalho, o nível de resistência ao  $Co^{2+}$  foi testado na faixa de 0,1 a 5,0 mM. Entre os considerados resistentes, apenas dois cresceram na concentração 5,0 mM. No caso do  $Ni^{2+}$ , 4 isolados foram considerados resistentes e foi observado o crescimento em 25 isolados (30,4%) na faixa testada (0,1-2,0 mM), abrangendo um espectro maior que o utilizado por NIES *et al.* (1987, 1989), COLLARD *et al.* (1993) e SPRINGAEL *et al.* (1993), isto é, 1,0 a 2,0 mM. Porém, trabalhos mais recentes utilizam uma faixa maior, variando de 0,5 a 20 mM (LIESEGANG *et al.*, 1993; STOPPEL e SCHLEGEL, 1995).



**FIGURA 4** – Eletroforese em gel de agarose 0,5% corado com brometo de etídio 0,5 $\mu$ g/ml. Extração de DNA segundo SAMBROOK *et al.* (1989), modificado, com o crescimento da cultura na presença de antibióticos. 1) AS5; 2) AS13A; 3) AS14; 4) AS16; 5) AS18; 6) AS18A; 7) AS20B; 8) AS23; 9) AS26; 10) AS29A.

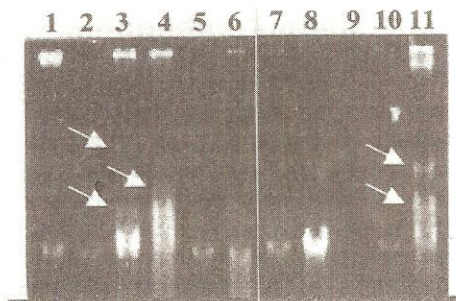


FIGURA 5 – Eletroforese em gel de agarose 0,5% corado com brometo de etídio 0,5µg/ml. 1) *E. coli* J53 pUR400; 2) AS31; 3) AS40; 4) AS42A; 5) AS43; 6) AS43A; 7) AS46B; 8) AS47A; 9) AS48; 10) *E. coli* EC206.

Verificou-se que 11 dos isolados (resistentes) testados apresentaram crescimento em concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$  relativamente altas (3,0 mM). Neste trabalho, utilizaram-se concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$  maiores ou iguais às testadas por outros autores, isto é, 0,1 a 1 mM (SAID e LEWIS, 1991; SPRINGAEL *et al.*, 1993; HARWOOD e GORDON, 1994). Observou-se que 79% dos isolados testados em  $\text{Cu}^{2+}$ , na faixa de concentração aqui usada (0,1-3,0 mM), cresceram, apesar da concentração relativamente alta. Esse fato é importante se comparado aos dados de DÍAZ-RAVIÑA *et al.* (1994), onde foi observado 50% de sobrevivência das linhagens de solo até um limite máximo de concentração 30 vezes menor que o utilizado neste trabalho (0,1 µM-0,66 µM).

Com relação ao  $\text{Hg}^{2+}$  observou-se crescimento em 21,25% dos isolados testados na faixa de concentração aqui usada (0,25-1,0 mM) e o aparecimento de um isolado resistente que cresceu nas concentrações mais altas, concentrações estas maiores que as utilizadas por SPRINGAEL *et al.* (1993), que variavam de 0,1 a 0,5 mM. Outros trabalhos utilizam uma faixa maior, isto é, de 5 µM a 1 mM (SAID e LEWIS, 1991).

Antes de se partir para a análise do DNA, faz-se necessário que, primeiramente, se consiga extrair o DNA total com uma certa pureza e integridade, fatos que, dependendo do método escolhido para análise, podem ser parâmetros críticos (LEFF *et al.*, 1995; ZHOU *et al.*, 1996).

Foram testados neste trabalho os métodos indicados por LEMOS (1980), KADO e LIU (1981), GRIMBERG *et al.* (1989), SAMBROOK *et al.* (1989), modificado, e XIANG *et al.* (1994), visando traçar o perfil plasmidiano das linhagens bacterianas que apresentaram crescimento nas concentrações testadas de metais pesados. Como os isolados pertenciam a vários gêneros de bactérias diferentes, se tornou difícil estabelecer um único método, que fosse reprodutível, para extrair o DNA plasmidiano de forma pura, íntegra e em alta concentração. Os métodos de Xiang, Lemos e de Grimberg, apesar de serem os métodos mais simples e rápidos, não serviram para que fossem traçados os perfis plasmidiano das amostras, provavelmente por serem mais específicos para plasmídios de baixo peso molecular, embora, paradoxalmente, seja indicado no trabalho de XIANG *et al.* (1994) que esse método é o mais indicado para plasmídios acima de 20Kb. Sabe-se que os plasmídios onde estão presentes estes determinantes de resistência para metais pesados, geralmente, variam entre 163Kb, como o pMOL28 (MERGEAY *et al.*, 1985), e 340Kb, como o pTOM8 (SCHMIDT e SCHLEGEL, 1994).

Utilizando o método de KADO e LIU (1981), mais indicado para plasmídios de alto peso molecular, variando de 4 a 538 Kb, obteve-se a visualização de plasmídios em 4 linhagens, AS14, AS16A, AS20A e AS20B (Fig. 1). Entretanto, este método mostrou-se inconveniente devido à alta viscosidade que a amostra apresenta, prejudicando a sua manipulação mesmo após a utilização de vários artifícios para diminuí-la, como: diluições, tratamento das células para diminuição da cápsula de EPS (polissacarídeo extracelular) seguido de precipitações sucessivas e crescimento em meio mínimo desbalanceado, para diminuir a formação de EPS. Outro fator que inviabilizou a utilização deste método foi a sua baixa reprodutividade para as linhagens aqui utilizadas.

Entretanto, com o método de SAMBROOK *et al.* (1989) modificado, apesar de ocorrer o mesmo problema com a reprodutividade, não houve problema algum com relação à viscosidade, e assim decidiu-se utilizar este método para as outras extrações. Neste método, procurou-se analisar a variação destes plasmídios de acordo com o agente seletivo (Figs. 2 e 3), sendo observados plasmídios diferentes, quando do cultivo dessas linhagens em meio com antibiótico ou metal pesado. Observou-se variação do perfil plasmidiano nas linhagens AS16A, AS44 e AS46A, AS50. Entretanto, apesar desses resultados, havia um inconveniente no tocante ao cultivo das linhagens. As linhagens cultivadas durante a noite na presença de antibiótico apresentaram crescimento satisfatório para se proceder a extração de DNA, enquanto que as linhagens cultivadas na presença de metal pesado, mesmo após vários dias de incubação, não apresentaram o crescimento necessário para a obtenção de DNA plasmidiano. Por isso, decidiu-se cultivar as células em meio apenas com

antibiótico, não tendo este o objetivo de selecionar nenhum plasmídeo, mas sim de proteger as linhagens contra o aparecimento de possíveis contaminantes. Observou-se, então, o aparecimento de plasmídios nas seguintes linhagens: AS20B, AS23, AS29A, AS40 e AS42A (Figs. 4 e 5). A ausência de plasmídios em outras linhagens não significa que eles não existam, podendo eles estar abaixo do limite de resolução do gel corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (50ng de DNA), devido ao pequeno número de cópias que esses plasmídios de alto peso molecular normalmente apresentam ou devido às dificuldades nas técnicas de extração de DNA, principalmente no passo de lise (SCHMIDT e SCHLEGEL, 1994).

### CONCLUSÕES

- É possível o isolamento de linhagens resistentes a fatores como antibióticos ou metais pesados de qualquer ambiente, devido à facilidade de transmissão da informação genética entre comunidades bacterianas que convivam neste mesmo ambiente.
- A fonte de carbono preferencial é a sacarose, na qual cresceram 50 dos isolados investigados. Tal preferência, provavelmente, advém do fato de que, no ambiente de origem (usina de produção de álcool e açúcar), a fonte de carbono mais abundante é a sacarose.
- Dos 82 isolados bacterianos testados, a maior frequência de resistentes (11) foi ao Cu<sup>2+</sup>, com o qual testou-se uma concentração 30 vezes maior que a descrita na literatura, seguida por 6 isolados resistentes ao Zn<sup>2+</sup>, 4 ao Cd<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup>, 2 ao Co<sup>2+</sup> e 1 ao Hg<sup>2+</sup>.
- Das 24 linhagens de solo que tiveram seu DNA extraído, 11 (AS14, AS16A, AS20A, AS20B, AS23, AS29A, AS40, AS42A, AS44, AS46A e AS50) apresentaram plasmídeo.
- Para as linhagens AS14, AS20A e AS20B, a técnica de KADO e LIU (1981) se mostrou satisfatória, enquanto que para as linhagens AS23, AS29A, AS40, AS42A, AS44, AS46A e AS50, a técnica de SAMBROOK *et al.* (1989) modificada apresentou melhores resultados. Para as linhagens AS16A e AS20B, ambas as técnicas se mostraram satisfatórias.
- O perfil plasmidial dessas linhagens pode ser alterado, pois seus plasmídios podem ser selecionados e induzidos por um agente seletivo, seja antibiótico ou metal.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHAT, M.A., TSUDA, M., HORIIKE, K., NOZAKI, M., VAIDYANATHAN, C.S. e NAKAZAMA, T. 1994 – Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1):307-312.
- BOPP, L.H. e EHRLICH, H.L. 1988 – Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Arch. Microbiol.* 150(5):426-431.
- BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. e PARKER, J. 1994 – **Biology of microorganisms.** Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- CERVANTES, C. e SILVER, S. 1992 – Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27:65-71.
- CERVANTES, C., OHTAKE, H., CHU, L., MISRA, T.K. e SILVER, S. 1990 – Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* 172(1):287-291.

- COLLARD, J.M., PROVOOST, A., TAGHAVI, S. e MERGEAY, M. 1993 – A new type of *Alcaligenes eutrophus* CH34 zinc resistance generated by mutations affecting regulation of the *cnr* cobalt-nickel resistance system. *J. Bacteriol.* 175(3):779-784.
- COSTA, S.O.P. 1987 – **Genética molecular e de microrganismos: os fundamentos da engenharia genética.** Editora Manole, São Paulo.
- COUTINHO, H.D.M., LIMA, T.C.S., PESSÔA, H.L.F., GRISI, B.M. e BONATO, M.C.M. 1995 – Resistência a metais pesados em bactérias isoladas de sistemas da agroindústria sucroalcooleira. In: 2º Encontro de Iniciação Científica da UFPB. Ed. Universitária, UFPB, João Pessoa.
- DÍAZ-RAVIÑA, M., BAATH, E. e FROSTEGARD, A. 1994 – Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7):2238-2247.
- DON, R.H. e PEMBERTON, J.M. 1981 – Properties of six pesticide degradation plasmid isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 145(2):681-686.
- FOSTER, T.J. 1987 – The genetics and biochemistry of mercury resistance. *Crit. Rev. Microbiol.* 15:117-140.
- FOSTER, T.J., NAKAHARA, H., WEISS, A.A. e SILVER, S. 1979 – Transposon A-generated mutations in the mercuric resistance genes of plasmid R100-1. *J. Bacteriol.* 140(1):167-181.
- GRIMBERG, J., MAGUIRE, S. e BELLUSCIO, L. 1989 – A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucl. Acids Res.* 17:21.
- HARWOOD, V.J. e GORDON, A.S. 1994 – Regulation of extracellular copper-binding proteins in *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(6):1749-1753.
- HIGHAN, D.P., SADLER, P.J. e SCAWEN, M.D. 1984 – Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesis novel cadmium proteins. *Science* 225:1043-1046.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. e WILLIAMS, S.T. 1994 – **Bergey's manual of systematic bacteriology.** 9ª ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- HORN, J.M., BRUNKE, M., DECKWER, W.D. e TIMMIS, K.N. 1994 – *Pseudomonas putida* strains which constitutively overexpress mercury resistance for biotransformation of organomercurial pollutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1):357-362.
- JAIN, R.K. e SAYLER, G.S. 1987 – Problems and potential for *in situ* treatment of environmental pollutants by engineered microorganisms. *Microbiol. Sci.* 4(2):59-63.
- KADO, C.I. e LIU, S.T. 1981 – Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145(3):1365-1373.
- KAMIZONO, A., NISHIZAWA, M., TERANISHI, Y., MURATA, K. e KIMURA, A. 1989 – Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 219:161-167.
- KIYONO, M., OMURA, T., FUJIMORI, H. e PAN-HOU, H. 1995 – Organomercurial resistance determinants in *Pseudomonas* K-62 are present on two plasmids. *Arch. Microbiol.* 163:242-247.
- KRUSE, H. e SØRUM, H. 1994 – Transfer of multiple drug resistance between bacteria of diverse origin in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(11):4015-4021.
- LEFF, L.G., DANA, J.R., McARTHUR, J.V. e SHIMKETS, L.J. 1995 – Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(3):1141-1143.
- LEMOS, M.V.F. 1980 – **Estudos genéticos no microrganismo fixador de nitrogênio *Azospirillum brasilense* (Krieg & Tarrano).** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.



- LIESEGANG, H., LEMKE, K., SIDDIQUI, R.A. e SCHLEGEL, H.G. 1993 – Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes* CH34. *J. Bacteriol.* 175(3):767-778.
- LIMA, T.C.R., COUTINHO, H.D.M., PESSÔA, H.L.F., GRISI, B.M. e BONATO, M.C.M. 1994 – Resistência a antibióticos e metais pesados em bactérias isoladas de solos cultivados com cana-de-açúcar na Paraíba. *Rev. Brasil. Genét.* 17(3; supl.):210.
- MAZODIER, P. e DAVIES, J. 1991 – Gene transfer between distantly related bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 25:147-171.
- MERGEAY, M., NIES, D., SCHLEGEL, H.G., GERITS, J., CHARLES, P. e VAN GIJSEGEM, F. 1985 – *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162(1):328-334.
- NADEAU, L.J., MENN, F.M., BREEN, A. e SAYLER, G.S. 1994 – Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1):51-55.
- NIES, A., NIES, D.H. e SILVER, S. 1989 – Cloning and expression of plasmid genes encoding resistances to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171(9):5065-5070.
- NIES, D.H. 1992 – Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid* 27:17-28.
- NIES, D.H., MERGEAY, M., FRIEDRICH, B. e SCHLEGEL, H.G. 1987 – Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* 169(10):4865-4868.
- QUENTMEIER, A. e FRIEDRICH, C.G. 1994 – Transfer and expression of degradative and antibiotic resistance plasmids in acidophilic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(3):973-978.
- RADFORD, A.J., OLIVER, J., KELLY, W.J. e REANNEY, D.C. 1981 – Translocable resistance to mercuric and phenylmercuric ions in soil bacteria. *J. Bacteriol.* 147(3):1110-1112.
- SAID, W.A. e LEWIS, D.L. 1991 – Quantitative assessment of the effects of metals on microbial degradation of organic chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(5):1498-1503.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. e MANIATIS, T. 1989 – **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- SCHMID, K., SCHUPFENER, M. e SCHMITT, R. 1982 – Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 151(1):68-76.
- SCHMIDT, T. e SCHLEGEL, H.G. 1994 – Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.* 176(22):7045-7050.
- SHANNON, M.J.R. e UNTERMAN, R. 1993 – Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction. *Ann. Rev. Microbiol.* 47:715-739.
- SILVER, S. e MISRA, T.K. 1988 – Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:717-743.
- SILVER, S., NUCIFORA, G., CHU, L. e MISRA, T.K. 1989 – Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions. *TIBS* 14:76-80.
- SIQUEIRA, J.O., MOREIRA, F.M.S., GRISI, B.M., HUNGRIA, M. e ARAÚJO, B.S. 1994 – **Microorganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental.** EMBRAPA, Brasília.
- SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. e HOLT, J.G. 1986 – **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.

- SPRINGAEL, D., DIELS, L., HOOYBERGHS, L., KREPS, S. e MERGEAY, M. 1993 – Construction and characterization of heavy metal-resistant haloaromatic-degrading *Alcaligenes eutrophus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1):334-339.
- STIEBER, M., HAESELER, F., WERNER, P. e FRIMMEL, F.H. 1994 – A rapid screening method for micro-organisms degrading polycyclic aromatic hydrocarbons in microplates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:753-755.
- STOPPEL, R.D. e SCHLEGEL, H.G. 1995 – Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(6):2276-2285.
- TOP, E., SMET, I., VERSTRAETE, W., DIJKMENS, R. e MERGEAY, M. 1994 – Exogenous isolation of mobilizing plasmids from polluted soils and sludges. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(3):831-839.
- TREVORS, J.T., BAKAY, T. e BOURQUIN, A.W. 1987 – Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review. *Can. J. Microbiol.* 33(3):191-198.
- TREVORS, J.T., STRATTON, G.W. e GADD, G.M. 1986 – Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32:447-464.
- WALSH, C.T., DISTEFANO, M.D., MOORE, M.J., SHEWCHUK, L.M. e VERDINE, G.L. 1988 – Molecular basis of bacterial resistance to organomercurial and inorganic mercuric salts. *Faseb J.* 2:124-130.
- XIANG, C., WANG, H., SHIEL, P., BERGER, P. e GUERRA, D.J. 1994 – A modified alkaline lysis protocol using a single microcentrifuge tube. *Biotechniques* 17(1):30-32.
- ZHOU, J., BRUNS, M.A. e TIEDJE, J.M. 1996 – DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2):316-322.