

Estudo dos mecanismos de resistência ao crómio em *Rhizobium* sp.

M. Rodrigues¹, S. Leocádio¹, I.V. Castro², F. Simões¹, D. Mendonça¹, J. Matos¹, L. Domingos³, P. Sá-Pereira^{1*}

¹Dept Biotecnologia, Grupo de Biologia Molecular, INETI, Estrada do Paço do Lumiar, 22, 1649-038 Lisboa, Portugal * (paula.pereira@ineti.pt)

²Dept Ecologia, Recursos Naturais e Ambiente, EFN-INIA, Quinta do Marquês, Av. República, Nova Oeiras, 2784-505 Oeiras, Portugal

³Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica, Campus de Gualtar 4710-057 Braga

A poluição ambiental por metais pesados exerce uma pressão selectiva sobre os seres vivos que nele habitam, de tal forma que estes são forçados a desenvolver respostas adaptativas ao meio que os rodeia. Alguns destes microrganismos que residem nestes ambientes desenvolveram ou adquiriram informação genética que neutraliza os efeitos tóxicos das elevadas concentrações de metais pesados, nomeadamente o crómio. Esta informação, está na sua maioria, localizada em plasmídeos, sequências de inserção, transposões e outros elementos que podem ser transferidos de umas bactérias para outras^(1,2). No que respeita ao crómio, as bactérias nas quais este mecanismo se encontra melhor estudado são a *Ralstonia metallidurans*⁽³⁾ e a *Pseudomonas aeruginosa*⁽⁴⁾. Segundo Juhnke *et al.*, (2002), existem dois operões de resistência ao cromato na *R. metallidurans*, um localizado no plasmídeo pMOL28, *chr₁* e outro no cromossoma *chr₂*. O operão *chr₁* (nesta estirpe) é constituído por 6 genes, *chrI*, *chrB₁*, *chrA₁*, *chrC*, *chrE* e o *chrF₁* e o *chr₂* possui três, *chrB₂*, *chrA₂* e o *chrF₂* e um factor rpoH. Ambos destoxificam o cromato por efluxo resultando numa diminuição do cromato na célula.

Neste trabalho pretendeu-se verificar se Rhizobios, isolados de nódulos de plantas que crescem na zona industrial de Estarreja, cujos solos se encontram contaminados com metais pesados, possuem genes de resistência ao crómio. Dos isolados testados apenas se obtiveram amplicons nas amostras correspondentes à estirpes de *S. meliloti* e de *R. leguminosarum*. Nestes amplificou-se um produto com cerca de 750 pb, que corresponde ao tamanho esperado para a amplificação com os primers desenhados.

A análise das sequências amplificadas revelou tratar-se de um transportador ABC. Sabe-se que este tipo de transportadores está envolvido no transporte de Ni²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ e Mo⁺ e também de péptidos e açúcares. Estes resultados sugerem que, possivelmente, nos isolados de *Rhizobium* em que se amplificou este transportador, este seja responsável pelo transporte de metais com actividade fisiológica e pelo efluxo de crómio através da membrana celular. No entanto para confirmar esta hipótese é necessário conhecer toda a zona a montante e a jusante da sequência amplificada, o que está a ser processado usando Genome Walking. Subsequentemente ir-se-á clonar e expressar os fragmentos de interesse.

¹Trajanovska, S., Britz, M. L., Bhave, M., (1997), Detection of heavy metal ion resistance genes in gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site, *Biodegradation*, 8:113-124

²Coombs, J. M., Barkay, T., (2004) Molecular Evidence for the Evolution of Metal Homeostasis Genes by Lateral Gene Transfer in Bacteria from the Deep Terrestrial Subsurface, *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1698-1707 Peitzsch *et al.*, 1998

³Peitzsch, N. Eberz, G. Nies, D.H., (1998), Alcaligenes eutrophus as a Bacterial Chromate sensor, *Applied and Environmental Microbiology*, 64:453-458

⁴Pimentel, B.E., Sánchez, M., Cervantes, C., (2002), Efflux of chromate by Pseudomonas aeruginosa cells expressing the ChrA protein, *FEMS Microbiology Letters*, 212:249-254

⁵Juhnke S, Peitzsch N, Hubener N, Grosse C, Nies DH. (2002) New genes involved in chromate resistance in Ralstonia metallidurans strain CH34. *Arch Microbiol.* 179(1):15-25.