



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 3 • número 2 • p 95 - 103

Identificação da Presença de Bactérias Resistentes a Metais em Solos não Contaminados por Poluição Industrial

A presença de metais nos solos pode ocorrer naturalmente ou como consequência de atividades humanas. Concentrações elevadas de metais nos solos podem revelar-se tóxicas para determinadas espécies bacterianas, levando ao seu desaparecimento da comunidade, enquanto outras não são afetadas pelo enriquecimento em metais do seu *habitat*, devido a já possuírem genes de resistência aos mesmos ou por adquirirem resistência em resultado da transferência horizontal de genes. Assim, a presença de bactérias resistentes a metais é expectável em solos contaminados com metais (como solos de regiões mineiras), nos quais estas são normalmente as espécies dominantes, o mesmo podendo não ocorrer em solos não contaminados. Neste estudo determinou-se a existência de bactérias resistentes a metais num solo não contaminado, através da cultura de células bacterianas presentes no elutriado do solo num meio enriquecido com cobre. Os resultados revelaram a presença de bactérias nos meios contaminados com 2,5 mM e 5 mM de cobre. Observou-se também a existência de um maior número de Unidades Formadoras de Colónias (UFCs) nas caixas na concentração de 5 mM, sugerindo que, nestas condições, o aumento de crescimento bacteriano ocorreu em estirpes resistentes ao cobre, devido à eliminação de estirpes sensíveis à toxicidade deste metal nesta concentração.

Palavras-chave

comunidade bacteriana do solo
cobre
resistência a metais

Anabela Lopes^{1,2}

Catarina Remédios¹•

Cláudia Deus¹

Susana Barros¹

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

² Laboratório de Fisiologia Aplicada, Departamento de Produção Aquática, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal.

• remedios@ua.pt

INTRODUÇÃO

As bactérias são dos organismos mais pequenos e abundantes existentes no solo (Whitman et al., 1998), desempenhando um papel importante no ciclo geoquímico de diversos elementos aí presentes (van der Heijden et al., 2008). Por exemplo, um grama de solo pode conter biliões de bactérias, as quais se estima poderão pertencer a 60000 espécies diferentes (Rinnan et al., 2009). A maioria destas espécies vive até 10 cm de profundidade, onde a matéria orgânica é mais abundante. Algumas espécies bacterianas são muito sensíveis a qualquer tipo de alteração no meio, por mais subtil que seja, enquanto outras são extremamente resistentes, suportando estados severos de calor, frio ou seca (Hall et al., 2010). Os diferentes graus de tolerância a agentes de *stress* ambiental podem determinar um crescimento ou uma decadência súbita da abundância de determinados grupos dentro da comunidade bacteriana num curto espaço de tempo, como resposta a mudanças de humidade, temperatura, substrato de carbono ou presença de contaminantes. Para obterem vantagem face às condições adversas, algumas bactérias produzem substâncias, como antibióticos, para suprimir competidores diretos; outras têm a capacidade de transformar e degradar alguns tipos de poluentes, nomeadamente em solos, assim como noutras matrizes (Autry e Ellis, 1992).

O material de origem do solo, os processos da sua formação e a composição e proporção dos constituintes da sua fase sólida são os principais contribuintes para a determinação da presença e da concentração naturais de metais (Fadigas et al., 2002). Por exemplo, solos formados a partir de rochas básicas apresentam maiores concentrações de metais quando comparados com solos formados sobre granitos e arenitos, pois as rochas básicas são naturalmente mais ricas nestes elementos (Oliveira et al., 1999). Além deste fator determinante, outros, como as condições físico-químicas dos solos, a matéria orgânica presente e o teor e a composição da fração de argila, podem exercer influência na concentração de metais (Barona e Romero, 1996). A contaminação do solo por metais exercida pelas atividades humanas contribui igualmente para o teor de metais que atualmente se encontra nos solos; a extração mineira, as indústrias madeireira e de transformação de metais, a combustão de carvão e o tráfego rodoviário são algumas das fontes de contaminação mais conhecidas (Arambarri et al., 1999; Jarup, 2003). Os metais apresentam algumas diferenças em relação à concentração em que existem naturalmente no solo, à sua importância biológica e à toxicidade que induzem em microrganismos desses *habitats*. Apesar da concentração de metais nos solos ser bastante variável, de uma forma geral o ferro (Fe) e o manganês (Mn) são dos metais mais abundantes nos solos (Fadigas et al., 2002), nutrientes e apresentam baixa toxicidade (Kavamura e Esposito, 2010). Por outro lado, o cobalto (Co), o cobre (Cu), o cromo (Cr), o níquel (Ni) e o zinco (Zn) existem em menores concentrações no solo (Fadigas et al., 2002), têm igual importância biológica, mas são tóxicos quando presentes em concentrações elevadas, normalmente originadas por diferentes tipos de atividades antropogénicas (Kavamura e Esposito, 2010).

Vários estudos toxicológicos têm-se focado na sensibilidade a contaminantes, como os metais, e na resistência de bactérias isoladas de diferentes *habitats* (Lu et al., 2006; Rathnayake et al., 2009; Abdelatey et al., 2011; Margesin et al., 2011). Algumas espécies bacterianas são inerentemente tolerantes a metais, vivendo no solo independentemente dos níveis de contaminação (Angle et al., 1993). A indução de alterações ao nível do genoma e do metabolismo são algumas das causas do desenvolvimento de resistência a metais em bactérias (Rathnayake et al., 2009). Esta capacidade permite utilizar bactérias com diferentes graus de sensibilidade/resistência como indicadores de poluição em solos. Como, normalmente,

em solos com concentrações elevadas de metais existe uma maior abundância de espécies bacterianas resistentes e em solos não contaminados ocorre uma dominância de bactérias não resistentes, então o *ratio* bactérias sensíveis/bactérias resistentes a metais existente num solo pode ser um índice de poluição fiável e sensível a pequenas variações de contaminação (Doelman et al., 1994). Os metais podem, portanto, atuar como importantes agentes seletivos, influenciando a dinâmica da evolução das comunidades bacterianas de um solo (Nithya et al., 2011).

Uma vez que a concentração de metais tem vindo a aumentar em diversos *habitats* bacterianos devido a processos naturais e antropogénicos, é possível encontrar nestes locais bactérias que desenvolveram diferentes mecanismos de resistência a estes elementos (e.g., por efluxo, acumulação e complexação no interior da célula, redução de iões metálicos a um estado de menor toxicidade, entre outros) (Nies, 1999). A resistência de bactérias do solo a metais pode ser determinada pelo método tradicional de cultura em placas com meio contaminado com soluções salinas de metais (Doelman et al., 1994; Abdelatey et al., 2011).

O objetivo deste trabalho é verificar a existência de bactérias cultiváveis com resistência a metais num solo não contaminado pela atividade industrial.



MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo e amostragem do solo

A amostra de solo utilizada neste estudo foi recolhida no Campus Universitário de Santiago da Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal. Uma vez que o local de amostragem está inserido num campus universitário, existente nesta área desde a década de 80, pelo menos existe a certeza que não ocorreu atividade industrial na área desde então.

A amostragem realizou-se em abril de 2011, tendo sido obtida uma amostra composta, resultante de três subamostras recolhidas em três pontos diferentes, da camada mais superficial do solo (0-10 cm). As partículas de maiores dimensões da amostra foram removidas utilizando um crivo com malha de 2 mm, sendo utilizada a fração de solo de dimensão inferior a 2 mm. A amostra fresca foi imediatamente transportada para o laboratório e processada.

Determinação da resistência a metais

Para determinar a presença de bactérias resistentes a metais colocou-se 5 g de solo num erlenmeyer de 100 mL previamente esterilizado, ao qual se adicionaram 45 mL de tampão PBS (Phosphate Buffered Saline; Gibco, Invitrogen, Reino Unido). A suspensão de solo foi homogeneizada num agitador orbital a 180 r.p.m., durante 30 minutos. De seguida, o elutriado foi decantado e realizaram-se diluições decimais seriadas (1/1, 1/10, 1/100 e 1/1000) com o mesmo tampão. Previamente foram preparados 3 conjuntos de placas de Petri de 90 mm de diâmetro com meio TSA (Tryptic Soy Agar, meio não seletivo para bactérias; Merck, Alemanha) suplementado com 100 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ciclohexamida (Acros Organics, Bélgica); o meio de dois desses conjuntos foi enriquecido com sulfato de cobre (II) pentahidratado (Panreac, Espanha), resultando numa concentração final de Cu no meio de 5 mM e 2,5 mM, respetivamente. Placas com meio não enriquecido com Cu foram usadas como controlo. As placas dos três grupos foram inoculadas com 500 μL de cada diluição do elutriado de solo, sendo o inóculo distribuído uniformemente pelas placas com um espalhador. Realizaram-se duas réplicas para cada condição (0 mM, 2,5 mM e 5 mM de Cu) e cada diluição

(1/1, 1/10, 1/100 e 1/1000). Para verificar a ausência ou presença de contaminação ao longo da experiência, foram transferidos 500 μ L de tampão PBS para placas de Petri contendo meio não enriquecido com Cu (controlo negativo). Na Figura 1 representam-se os tratamentos experimentais utilizados. Todas as placas foram incubadas a 28° C, durante 48 h. Após este tempo de incubação, procedeu-se à contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFCs) presentes nas placas.

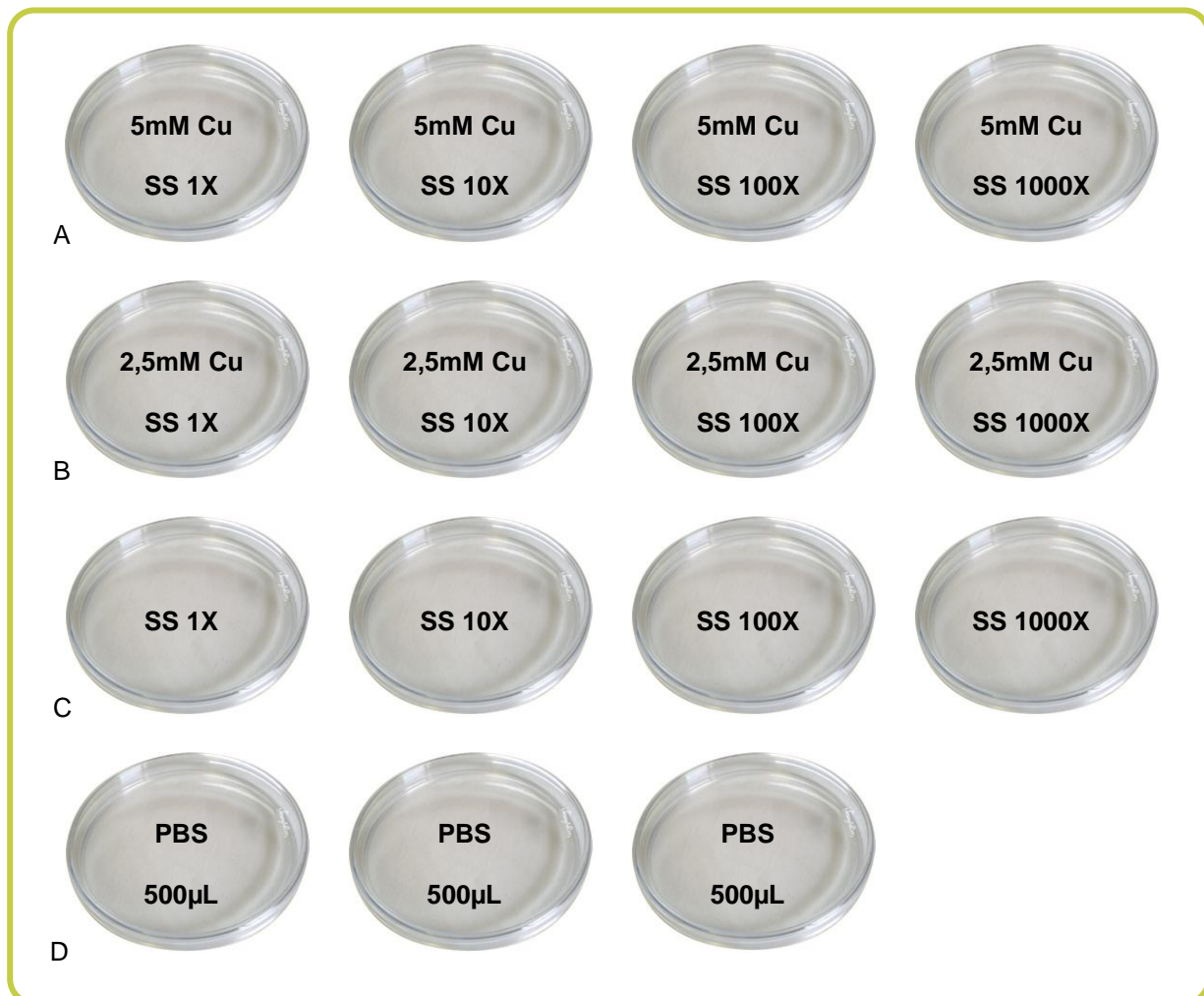


FIGURA 1: Esquema das placas com meio (A) enriquecido com 5 mM de Cu, (B) enriquecido com 2,5 mM de Cu e (C) não enriquecido com Cu (controlo) a inocular com as diferentes diluições da suspensão de solo (SS); (D) placas com meio não enriquecido com Cu a adicionar o tampão PBS (controlo negativo).

RESULTADOS

Após o tempo de incubação, foram observadas todas as placas de Petri e, uma vez que o número de UFCs presente em algumas placas era incontável, estas foram fotografadas, tendo sido posteriormente feita uma análise qualitativa dos resultados com base nessa observação.

Após 48h, as placas de controlo negativo, às quais foi adicionado apenas PBS, não apresentaram crescimento de UFCs (Figura 2A), traduzindo a ausência de contaminação por bactérias não pertencentes à amostra ao longo do processo de trabalho. Constatou-se também que, tal como era esperado, o número de UFCs nas placas de controlo (sem Cu adicionado) diminuiu com o aumento das diluições do elutriado do

solo, sendo que o maior número de UFCs foi observado na diluição 1/1 e o menor na diluição de 1/1000 (Figura 2B-E). Apesar do número de UFCs diminuir a cada diluição do elutriado, não foi possível realizar uma contagem correta das UFCs, nem mesmo na diluição de 1/1000, devido à sua abundância. Assim, para obter UFCs individualizadas e em menor número, seria necessário utilizar diluições mais elevadas do elutriado de forma a permitir a sua contagem.



FIGURA 2: Fotografias das placas de cultura após 48h de incubação: (A) Controle negativo; (B a E) Controle inoculado com as diluições (B) 1/1, (C) 1/10, (D) 1/100 e (E) 1/1000 do elutriado de solo.

O mesmo resultado foi obtido em relação às placas de meio enriquecido com Cu (2,5 mM e 5 mM) inoculadas com o elutriado de solo, ou seja, o número de UFCs diminuiu com o aumento do fator de diluição do elutriado (Figuras 3 e 4). Uma réplica das placas contendo meio enriquecido com 2,5 mM e 5 mM de Cu, correspondendo à diluição de 1/1000, chegou mesmo a não apresentar crescimento de UFCs (Figuras 3D e 4D). Comparando as placas com meio enriquecido com Cu com as placas de controle, observou-se que ocorreu um menor crescimento de UFCs no meio enriquecido com 2,5 mM de Cu do que no meio sem Cu, relativamente a todas as diluições; contudo, o mesmo não sucedeu em algumas réplicas das concentrações de 5 mM de Cu, nas quais o número de UFCs formadas foi superior ao do controle. Verificou-se ainda que o número de UFCs formadas no meio com 2,5 mM de Cu, para todas as diluições (Figura 3A-D), é menor do que o observado nas placas com concentração de Cu de 5 mM (Figura 4A-D).

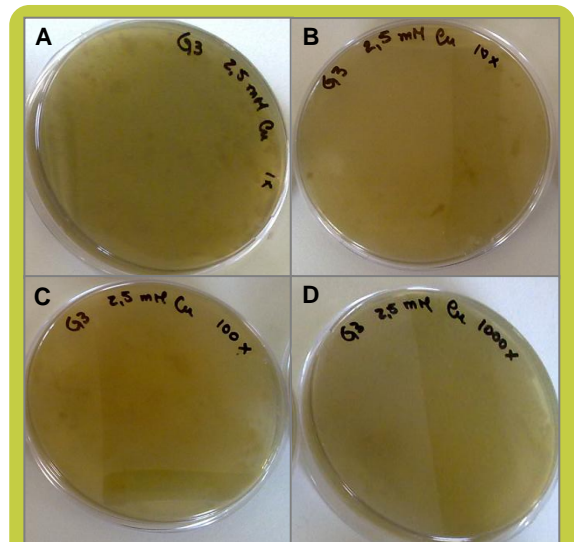


FIGURA 3: Fotografias das placas de cultura contendo meio enriquecido com 2,5 mM de Cu, após 48h de incubação, inoculadas com as diluições (A) 1/1, (B) 1/10, (C) 1/100 e (D) 1/1000 do elutriado de solo.

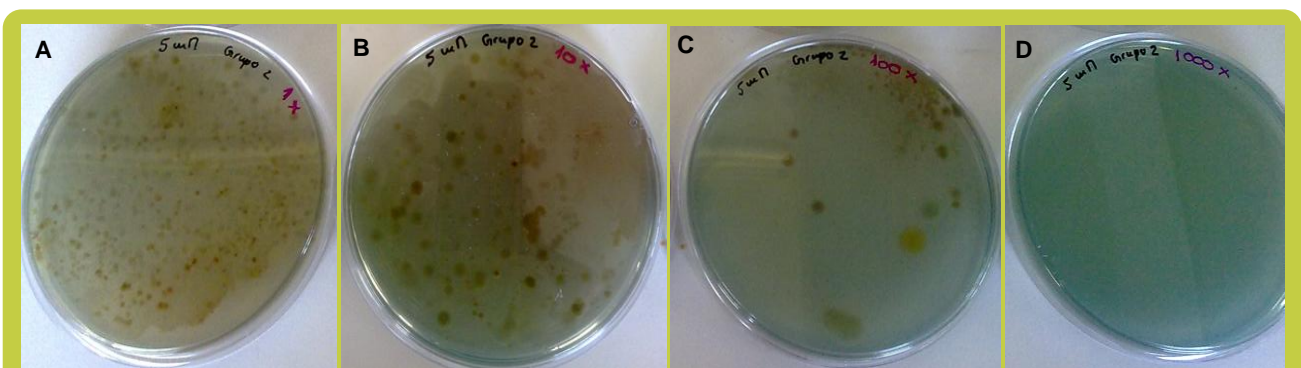


FIGURA 4: Fotografias das placas de cultura contendo meio enriquecido com 5 mM de Cu, após 48h de incubação, inoculadas com as diluições (A) 1/1, (B) 1/10, (C) 1/100 e (D) 1/1000 do elutriado de solo.



DISCUSSÃO

A diminuição do número de UFCs formadas com o aumento da diluição do inóculo foi observada nas três condições de cultura (0 mM, 2,5 mM e 5 mM de Cu). Isto deve-se ao facto de a diluição da suspensão inicial de solo diminuir o número de células bacterianas em suspensão, correspondendo a menos UFCs formadas a cada diluição.

As bactérias têm uma grande facilidade de adsorver e acumular iões metálicos (Volesky, 2001) e de desenvolver variadas estratégias de tolerância a estes. Vários estudos realizados mostram que o aumento da concentração de metais no solo provoca um aumento da tolerância da comunidade bacteriana aos mesmos (Pennanen et al., 1996; Baath et al., 1998). Devido à pressão seletiva destes contaminantes no ambiente, as bactérias têm adquirido vários mecanismos de resistência que incluem exclusão por barreira de permeabilidade, transporte ativo, bombas de efluxo, desintoxicação enzimática, redução da sensibilidade dos alvos celulares a iões metálicos (Oehme et al., 2000). Estes mecanismos de tolerância são frequentemente transmitidos por plasmídeos através de transferência horizontal de genes, levando a adaptações por parte da comunidade bacteriana (Sobecky e Coombs, 2009). Observou-se que ocorreu o crescimento de bactérias no meio enriquecido com Cu, a 2,5 mM e a 5 mM, sendo o número de UFCs formadas, nas placas com 2,5 mM e em algumas réplicas das placas com 5 mM de Cu, inferior ao número de UFCs geradas no meio com 0 mM de Cu. Estes resultados demonstram a existência de bactérias com resistência ao Cu neste solo, uma vez que a adição deste metal ao meio não permitiria o crescimento de bactérias para as quais o Cu é tóxico. Assim, apesar de considerar-se tratar de um solo não contaminado com metais, este alberga algumas espécies bacterianas que adquiriram resistência ao Cu e muito certamente a outros metais. Vários estudos mostram que o desenvolvimento da tolerância a metais em bactérias e fungos tem sido observado em solos enriquecidos com uma série de metais, incluindo Zn, Cu, Ni, chumbo (Pb) e cádmio (Cd), a diversas concentrações (Diaz-Ravina et al., 1994; Diaz-Ravina e Baath, 1996). Supõe-se que o local de amostragem não seja um local contaminado com poluição industrial, no entanto são muitas as fontes de contaminação a que o solo pode estar sujeito e as propriedades deste podem apresentar variações, sendo influenciadas por muitos fatores, na maioria das vezes de origem antropogénica (Turner, 2009). Os contaminantes metálicos podem, portanto, chegar ao solo por diversas vias e vindos de diferentes fontes: através de substâncias adicionadas aos solos (como pesticidas e fertilizantes), derrames acidentais de produtos químicos industriais e comerciais, poeiras transmitidas através do ar que se depositam ou pela precipitação (Turner, 2009)

Nas placas contendo meio enriquecido com 2,5 mM e 5 mM de Cu, observou-se que ocorreu crescimento de bactérias para todas as diluições de solo, indicando a presença de comunidades bacterianas no solo resistentes a Cu nestas concentrações. Estes resultados vão ao encontro de outros estudos em que a resistência ao Cu por parte das bactérias é observada tipicamente entre as concentrações de 1 mM e 40 mM, dependendo das espécies bacterianas (Hasman et al., 2009), as quais são também capazes de crescer na presença de outros metais e a outras concentrações, nomeadamente até 10 mM de Zn e 3 mM de Pb (Margesin et al., 2011). Contrariamente ao que era esperado, na concentração de 5 mM de Cu, verificou-se um maior número de UFCs para todas as diluições em relação à concentração de 2,5 mM. Uma explicação para este fenómeno é a eliminação de espécies bacterianas não resistentes a esta concentração de Cu que, nos outros meios mais pobres em Cu, competiam com as espécies resistentes. A esta

concentração de Cu, as espécies outrora dominantes não se desenvolvem, permitindo um maior crescimento das bactérias resistentes a este metal. Esta hipótese é apoiada pela comparação do crescimento de UFCs no meio de controlo e no meio enriquecido com 5 mM de Cu, uma vez que, também ao contrário do que se esperava observar, em algumas destas réplicas foi detetado um crescimento bacteriano mais acentuado nas placas com 5 mM de Cu relativamente àquelas em que o metal não estava presente. Assim, seria mais interessante determinar quais as espécies que apresentam resistência ao Cu e não apenas o número de UFCs com esta característica, pois, apesar de se ter observado em algumas placas com 5 mM de Cu um maior número de UFCs comparativamente às placas de controlo, este maior crescimento não traduz a diversidade bacteriana presente em cada condição. Adicionalmente, a presença de genes de resistência a metais nestas UFCs poderia ser determinada facilmente. Testando os isolados para a presença de genes de resistência a metais já conhecidos, através da sua amplificação por PCR¹, seria possível determinar quais aqueles que se observavam nestas espécies e que lhes conferiam a capacidade de tolerar metais, assim como o mecanismo de proteção codificado por eles.

CONCLUSÃO

Está largamente confirmado na literatura que os solos contaminados com metais (e.g., áreas mineiras e industriais) são propensos ao desenvolvimento de resistência em microrganismos, devido à elevada concentração destes compostos. Contudo, o presente estudo revelou igualmente a existência de bactérias resistentes a metais, nomeadamente ao Cu, num solo não contaminado. Observou-se o desenvolvimento de células bacterianas provenientes desse solo em duas condições de cultura, 2,5 mM e 5 mM de Cu. O maior crescimento de bactérias no meio com 5 mM de Cu, comparativamente ao meio com metade dessa concentração, sugere ainda que, em concentrações de Cu mais elevadas, a eliminação das espécies naturalmente dominantes em condições naturais permitiu o desenvolvimento das espécies resistentes ao Cu. Assim, e uma vez que os metais podem atuar como agentes seletivos, a presença de bactérias resistentes a metais neste solo permite antever uma dominância destas espécies num episódio de contaminação. Futuramente, seria interessante comparar a diversidade das bactérias presentes neste solo que apresentam resistência e sensibilidade a metais, complementando a informação dada pelo crescimento de UFCs.

¹ PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica utilizada em biologia molecular que permite a síntese de um elevado número de cópias de uma sequência específica de ADN, após vários ciclos térmicos. Cada ciclo de amplificação consiste em 3 fases: desnaturação - separação das cadeias de dupla hélice de ADN; *annealing* - ligação dos *primers* (sequências iniciadoras) à região complementar da cadeia molde; extensão - síntese da nova cadeia de ADN complementar à cadeia molde, catalisada por uma DNA polimerase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelatey LM, Khalil WKB, Ali TH, Mahrous KF (2011). Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal of resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Egyptian soils. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation* 6: 201-211.
- Angle JS, Chaney RL, Rhee D (1993). Bacterial resistance to heavy metals related to extractable and total metal concentrations in soil and media. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1443-1446.
- Arambarri I, Garcia R, Millán E (1999). Relationships between metal contents in soil and grass contaminated by different anthropogenic sources. *Toxicological and Environmental Chemistry* 72: 221-231.
- Autry AR, Ellis GM (1992). Bioremediation - an Effective Remedial Alternative for Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Environmental Progress* 11: 318-323.
- Baath E, Diaz-Ravina M, Frostegard S, Campbell CD (1998). Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 238-245.
- Barona A, Romero F (1996). Distribution of metals in soils and relationships among fractions by principal component analysis. *Soil Technology* 8: 303-319.
- Diaz-Ravina M, Baath E, Frostegard A (1994). Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2238-2247.
- Diaz-Ravina M, Baath E (1996). Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2970-2977.
- Doelman P, Jansen E, Michels M, Vantil M (1994). Effects of Heavy-Metals in Soil on Microbial Diversity and Activity as Shown by the Sensitivity-Resistance Index, an Ecologically Relevant Parameter. *Biology and Fertility of Soils* 17: 177-184.
- Fadigas FS, Amaral-Sobrinho NMB, Mazur N, Anjos LHC, Freixo AA (2002). Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros. *Bragantia, Campinas* 61: 151-159.
- Hall EK, Singer GA, Kainz MJ, Lennon JT (2010). Evidence for a temperature acclimation mechanism in bacteria: an empirical test of a membrane-mediated trade-off. *Functional Ecology* 24: 898-908.
- Hasman H, Bjerrum MJ, Christiansen LE, Hansen HCB, Aarestrup FM (2009). The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth media. *Journal of Microbiological Methods* 78: 20-24.
- Jarup L (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68: 167-182.
- Kavamura VN, Esposito E (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances* 28: 61-69.
- Lu WB, Shi JJ, Wang CH, Chang JS (2006). Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp J1 possessing high heavy-metal resistance. *Journal of Hazardous Materials* 134: 80-86.
- Margesin R, Plaza GA, Kasenbacher S (2011). Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. *Chemosphere* 82: 1583-1588.
- Nies DH (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology* 51: 730-750.
- Nithya C, Gnanalakshmi B, Pandian SK (2011). Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. *Marine Environmental Research* 71: 283-294.
- Oehme FW, Bruins MR, Kapil S (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45: 198-207.
- Oliveira TSd, Costa LMd, Cruz CD, Horn HA (1999). Metais pesados como indicadores de materiais de origem em uma topolitoseqüência do Triângulo Mineiro, Estado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1451-1465.
- Pennanen T, Frostegard A, Fritze H, Baath E (1996). Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 420-428.
- Rathnayake IVN, Megharaj M, Bolan N, Naidu R (2009). Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 53: 1185 - 1189.
- Rinnan R, Rousk J, Yergeau E, Kowalchuk GA, Baath E (2009). Temperature adaptation of soil bacterial communities along an Antarctic climate gradient: predicting responses to climate warming. *Global Change Biology* 15: 2615-2625.
- Sobecky PA, Coombs JM (2009). Horizontal gene transfer in metal and radionuclide contaminated soils. *Methods in Molecular Biology* 532: 455-472.
- Turner AH (2009). Urban Agriculture and Soil Contamination: An Introduction to Urban Gardening. Finance, <http://cepm.louisville.edu>.

van der Heijden MG, Bardgett RD, van Straalen NM (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296-310.

Volesky B (2001). Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59: 203-216.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6578-6583.