

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA
SUBÁREA SANEAMENTO AMBIENTAL**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA AO
MERCÚRIO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DA
REDUÇÃO DO Hg (II) AO ESTADO ELEMENTAR**

Ana Claudia Santiago de Vasconcellos

**Rio de Janeiro
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

“Avaliação da resistência bacteriana ao mercúrio através da quantificação da redução do Hg(II) ao estado elementar”

por

Ana Claudia Santiago de Vasconcellos

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas

Rio de Janeiro, março de 2010.

Esta dissertação, intitulada

“Avaliação da resistência bacteriana ao mercúrio através da quantificação da redução do Hg(II) ao estado elementar”

apresentada por

Ana Claudia Santiago de Vasconcellos

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Julio César de Faria Alvim Wasserman

Prof. Dr. Josino Costa Moreira

Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas – Orientador

Dissertação defendida e aprovada em 31 de março de 2010.

Aos meus pais, Hugo José e Sonia, que nunca pouparam esforços para que eu continuasse estudando. A vocês, minhas homenagens e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Rubens G. Barrocas, pelas grandes contribuições teóricas, paciência, dedicação, amizade e contribuição fundamental para realização deste trabalho. A quem devo um agradecimento especial pela valiosa colaboração.

Aos queridos professores e colegas de trabalho da FIOCRUZ:

-A Dr. Silvana Couto Jacob pela postura sempre amistosa e atenciosa, pelo incentivo e pela colaboração no sentido de criar as condições para realização dessa pesquisa no Departamento de Química do INCQS.

-Aos colegas de laboratório Adriana de Lima e Sheila Duque pela amizade, paciência e por todas as contribuições para o desenvolvimento deste estudo.

-Ao Jaylei Monteiro Gonçalves pela ajuda fundamental para execução das análises de mercúrio no INCQS.

Aos meus queridos amigos Silvia Lisboa, Juliana Barbosa e Rafael Marques. Agradeço também pela amizade sincera e por todos os momentos felizes que passamos juntos.

Ao meu eterno namorado, Leonardo Martha de Souza Lima, pela cumplicidade, pela amizade, pela paciência e pela atenção. Agradeço a você pela ajuda fundamental para realização deste trabalho.

A minha mãe Sonia e ao meu pai Hugo José pela minha vida.

Aos componentes da banca pela gentileza de aceitarem o convite para análise deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e pelo financiamento deste trabalho de pesquisa (Convênio PAPES IV / Fiocruz).

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Esquema representando o Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio..... | 17 |
| Figura 2 – Esquema representando o mecanismo enzimático de redução do mercúrio..... | 23 |
| Figura 3 – Mapa do Brasil destacando os locais de coleta de amostras ambientais | 30 |
| Figura 4 – Estrutura química do Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA)..... | 35 |
| Figura 5 – Esquema representando o procedimento para isolamento de cepas resistentes ao mercúrio..... | 37 |
| Figura 6 – Fotos da placa Elisa e do filme de Raios-X..... | 43 |
| Figura 7 – Foto do Sistema de Redução do Hg(II) em mercúrio elementar..... | 46 |
| Figura 8 – Distribuição percentual de isolados bacterianos no estado do Rio de Janeiro de acordo com os valores de MIC..... | 64 |
| Figura 9 - Distribuição percentual de isolados bacterianos no estado de Rondônia de acordo com os valores de MIC..... | 64 |
| Figura 10 - Distribuição percentual de isolados bacterianos no estado do Mato Grosso de acordo com os valores de MIC..... | 65 |
| Figura 11 – Distribuição percentual de isolados bacterianos no estado do Rio de Janeiro de acordo com o Teste de Gram..... | 73 |
| Figura 12 – Distribuição percentual de isolados bacterianos no estado de Rondônia de acordo com o Teste de Gram..... | 74 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 - Distribuição percentual de isolados bacterianos no estado do Mato Grosso de acordo com o Teste de Gram..... | 74 |
| Figura 14- Foto do gel de eletroforese..... | 81 |
| Figura 15 – Foto do filme de raios-X..... | 83 |
| Figura 16 – Redução bacteriana de 5 μ M Hg em 4 horas de incubação..... | 89 |
| Figura 17 – Controles do ensaio de volatilização bacteriana do mercúrio..... | 90 |
| Figura 18 – Redução bacteriana de 10 μ M Hg em 4 horas de incubação..... | 92 |
| Figura 19 – Redução bacteriana de 5 μ M Hg em 2 horas de incubação em diferentes inóculos bacterianos (Hg em Caldo Nutriente)..... | 95 |
| Figura 20 – Redução bacteriana de 5 μ M Hg em 2 horas de incubação em diferentes inóculos bacterianos (Hg em Permanganato de Potássio)..... | 96 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Transformações mercuriais durante o Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio..... | 16 |
| Quadro 2 – Determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Seletiva em Meio de Cultura Ágar Nutriente..... | 52 |
| Quadro 3 – Variação da Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio em Função do Meio de Cultura..... | 56 |
| Quadro 4 – Perfil de resistência aos antibióticos testados nas cepas isoladas com valores de MIC mais elevados..... | 71 |
| Quando 5 – Caracterização das cepas bacterianas isoladas com os valores de MIC mais elevados..... | 78 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de amostras de água coletadas em diferentes sistemas aquáticos brasileiros e de cepas bacterianas isoladas das mesmas.....61

Tabela 2 - Avaliação da resistência bacteriana aos antibióticos nos diferentes sistemas aquáticos brasileiros.....70

RESUMO

O mercúrio (Hg) pode ser considerado um dos elementos de maior potencial tóxico graças à sua capacidade de bioacumulação e de biomagnificação ao longo das cadeias tróficas. O uso crescente do mercúrio pelo homem tem provocado sensíveis alterações em seu ciclo biogeoquímico, comprometendo à saúde de populações humanas expostas. As bactérias realizam funções fundamentais na ciclagem do mercúrio, que uma vez lançado no meio ambiente, atua selecionando cepas bacterianas resistentes. O mecanismo de resistência ao mercúrio mais estudado é mediado pelo gene *merA* e consiste na redução do Hg(II) em mercúrio elementar. O uso de bactérias resistentes é considerado uma abordagem promissora para biorremediação de ambientes contaminados por mercúrio. Neste trabalho, foram coletadas amostras de água em diversos ecossistemas aquáticos brasileiros com o objetivo de isolar e caracterizar cepas bacterianas resistentes ao mercúrio com potencial biorremediador. Foram isoladas cepas resistentes / tolerantes em todas as amostras de água coletadas. No total, obteve-se 151 isolados bacterianos de 22 amostras de água coletadas em 3 estados brasileiros (RJ, MT e RO). O teste de Gram revelou que 71,5% dos isolados são bastonetes Gram-negativos. Apenas 6% das bactérias isoladas apresentaram valores de MIC $\geq 20 \mu\text{M}$ Hg. Essas cepas foram identificadas como *Klebsiella oxytoca* (RJ), *Leclercia adenocarboxylata* (RJ), *Aeromonas caviae* (RJ), *Bacillus subtilis* (MT), *Staphylococcus hominis* (MT), *Staphylococcus epidermis* (MT), *Paenibacillus alvei* (MT). Os testes de sensibilidade a antibióticos revelaram que as amostras de Mato Grosso com MIC $\geq 20 \mu\text{M}$ Hg foram resistentes a todos os antibióticos testados, sendo classificadas como multi-resistentes. Os ensaios de volatilização com a cepa *Leclercia adenocarboxylata* mostraram que essa cepa foi capaz de reduzir cerca de 70% do mercúrio adicionado ao meio de cultura em apenas duas horas de incubação. Esse resultado aponta para o potencial desta abordagem para a remoção de mercúrio inorgânico de soluções aquosas, como efluentes líquidos industriais, o que contribuiria para a redução da contaminação ambiental por mercúrio, reduzindo o seu risco para a saúde humana.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| DEDICATÓRIA..... | I |
| AGRADECIMENTOS..... | II |
| LISTA DE FIGURAS..... | III |
| LISTA DE QUADROS..... | V |
| LISTA DE TABELAS..... | VI |
| RESUMO..... | VII |
| 1.0 – INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 - A História do Mercúrio..... | 1 |
| 1.2 - A Química do Mercúrio..... | 4 |
| 1.3 - Acidentes com o Mercúrio..... | 6 |
| 1.4 - O Metabolismo e a Toxicidade do Mercúrio..... | 9 |
| 1.5 - O Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio..... | 11 |
| 1.6 - A Resistência Bacteriana ao Mercúrio..... | 18 |
| 2.0 - CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO PARA A SAÚDE PÚBLICA..... | 25 |
| 3.0 – OBJETIVOS..... | 27 |
| 3.1 – Objetivo Geral..... | 27 |
| 3.2 – Objetivos Específicos..... | 27 |
| 4.0 - MATERIAL & MÉTODOS..... | 29 |
| 4.1 - Áreas de Estudo e Coleta das Amostras Ambientais | 29 |
| 4.1.1 - Áreas de Estudo | 29 |
| 4.1.2 - Coleta das Amostras de Água | 31 |

| | |
|--|----|
| 4.2 – Desenvolvimento de uma Metodologia para Isolamento de Bactérias Resistentes ao Mercúrio..... | 32 |
| 4.2.1 – Determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Seletiva..... | 32 |
| 4.2.2 – Avaliação da Susceptibilidade Bacteriana ao Mercúrio em Função da Composição do Meio de Cultura..... | 33 |
| 4.2.3 - Avaliação do Efeito do Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA) na Concentração Mínima Inibitória (MIC) de Mercúrio..... | 34 |
| 4.2.4 - Isolamento das Cepas Resistentes ao Mercúrio..... | 35 |
| 4.3 – Determinação da Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio (MIC)..... | 37 |
| 4.4 – Avaliação da Resistência Bacteriana a Antibióticos..... | 38 |
| 4.5 - Identificação das Cepas Bacterianas Isoladas..... | 39 |
| 4.6 - Amplificação do gene <i>merA</i> | 39 |
| 4.7 - Método do Filme de Raios-X para Detecção da Volatilização Bacteriana do Hg(II)..... | 41 |
| 4.8 - Ensaio da Redução Bacteriana do Hg(II) em Hg ⁰ | 43 |
| 4.8.1 - Preparo das Células Bacterianas para o Ensaio da Redução..... | 43 |
| 4.8.2 - Quantificação da Redução do Hg(II) em Hg ⁰ | 44 |
| 4.8.3 - Condições Experimentais Testadas..... | 46 |
| 4.8.3.1 - Tempo de incubação..... | 47 |
| 4.8.3.2 - Concentração de Mercúrio..... | 47 |

| | |
|--|----|
| 4.8.3.3 - Inóculo Bacteriano..... | 48 |
| 4.8.4 - Análise de Mercúrio por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio..... | 48 |
| 5.0 - RESULTADOS & DISCUSSÃO..... | 50 |
| 5.1 – Desenvolvimento de uma Metodologia para Isolamento de Bactérias Resistentes..... | 50 |
| 5.1.1 - Determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Seletiva..... | 50 |
| 5.1.2 - Avaliação da Susceptibilidade Bacteriana ao Mercúrio em Função da Composição do Meio de Cultura..... | 53 |
| 5.1.3 - Avaliação do Efeito do Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA) na Concentração Mínima Inibitória (MIC) de Mercúrio..... | 56 |
| 5.1.4 - Isolamento de Bactérias Resistentes ao Mercúrio..... | 58 |
| 5.2 – Determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Inibitória (MIC)..... | 61 |
| 5.3 - Avaliação da Resistência Bacteriana aos Antibióticos..... | 68 |
| 5.4 – Identificação das Cepas Bacterianas Isoladas..... | 72 |
| 5.5 - Amplificação do gene <i>merA</i> | 79 |
| 5.6 - Detecção do Hg ⁰ utilizando filme de raios-X..... | 82 |
| 5.7 - Quantificação da Redução do Hg(II) em Hg ⁰ | 84 |
| 6.0 – CONCLUSÃO..... | 97 |
| 7.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 99 |

1.0- INTRODUÇÃO

1.0– A História do Mercúrio

A relação dos humanos com o mercúrio existe desde épocas remotas. O homem pré-histórico usava um minério do mercúrio de cor avermelhada, o cinábrio ou sulfeto de mercúrio, para escrever e desenhar nas paredes de cavernas e em objetos de argila. Também é muito antigo, o uso do mercúrio em cerimônias religiosas e místicas. Há evidências de que esse metal fazia parte de rituais de sepultamento na Grécia e no Egito no ano de 1500 a.C. (Graeme & Pollock, 1998; Stillman, 2003). Ao longo dos anos, o conhecimento do homem sobre as propriedades químicas do mercúrio foi expandido e conseqüentemente, o uso desse metal pela sociedade tornou-se imprescindível.

O nome dado ao elemento químico mercúrio é uma referência ao deus romano Mercúrio, conhecido por ser o mensageiro dos deuses. Mercúrio também era o deus dos mercadores e do comércio (www.dartmouth.edu). Acredita-se que o primeiro registro sobre o uso do mercúrio tenha sido escrito por volta do ano 400 a.C, por Aristóteles em sua obra *Meteorologia e De Anima*. Foi Aristóteles quem o denominou *Hydrargyrum*, que quer dizer água prateada. Deve-se a esse fato, a escolha de seu símbolo atômico Hg (www.dartmouth.edu; Barrocas, 1994; Azevedo, 2003).

Possivelmente, o primeiro uso comercial do mercúrio tenha sido a amalgamação. Os romanos, que provavelmente herdaram conhecimento sobre as aplicações do mercúrio dos gregos, tornaram o uso do mercúrio na extração de ouro e de outros metais muito popular (Graeme & Pollock, 1998). No século XVII, época em que se priorizava o acúmulo de metais, grandes quantidades de mercúrio foram usadas para extrair prata em minas por todo continente americano. Além disso, neste período, o mercúrio teve participação fundamental no desenvolvimento de instrumentos de medição (ex.: termômetros, barômetros e etc) e em processos industriais. Na segunda metade do século XVIII, toneladas de mercúrio eram consumidas anualmente durante a mineração e a maior parte deste mercúrio vinha das Minas de Almadén, na Espanha, onde era extraído por escravos. Foi nesta época, que os riscos à saúde envolvendo uso do mercúrio começaram a ser percebidos o que contribuiu para que ao longo dos anos o uso deste metal se tornasse restrito à medicina (Azevedo, 2003; www.webelements.com/mercury).

Embora o conhecimento sobre as propriedades biocidas do mercúrio e de seus compostos seja bastante antigo, foi durante o século XVIII que o uso de pomadas que continham mercúrio como princípio ativo tornou-se popular. Essas pomadas foram usadas durante anos para tratamento de doenças de pele e sífilis. Foi nesta época que a frase *“uma noite com Vênus e o restante da vida com Mercúrio”* tornou-se famosa (Hobman & Brown, 1997). Mesmo com a descoberta dos antibióticos o uso do mercúrio teve continuidade na medicina sendo usado até

hoje na odontologia para produção de amálgamas dentárias e também, como conservante de vacinas.

O mercúrio devido à sua característica atípica de se manter líquido à temperatura ambiente só foi considerado um metal na segunda metade do século XVIII e só no fim desse século, foi reconhecido como elemento químico por Antoine Laurent Lavoisier (Queiroz, 1995).

1.1 – A Química do Mercúrio

O mercúrio elementar (Hg^0) é o único metal que pode ser encontrado no estado líquido em temperatura ambiente, passando facilmente para o estado gasoso nessa mesma condição. Além disso, é um bom condutor elétrico, tem baixo ponto de fusão e baixa solubilidade em água (6 μg em 100 mL de água a 25°C) (Morel *et al.*, 1998; Hammond, 2000).

O mercúrio é encontrado na crosta da Terra na sua forma elementar e nas formas minerais do sulfeto de mercúrio como cinábrio, metacinábrio e hipercinábrio. Sabe-se que no interior da crosta terrestre, as concentrações de mercúrio podem variar entre 21 e 56 ppb, dependendo da profundidade onde é encontrado (Barkay *et al.* 2003). As formações geológicas mais abundantes em minérios do mercúrio se localizam na Espanha, na Itália, nos Estados Unidos, no México, na China e no Japão. No Brasil, não existem registros de minas de mercúrio por esse motivo todo mercúrio usado aqui é importado (Barrocas, 1994).

As espécies químicas do mercúrio podem ser classificadas em três grandes categorias:

- Espécies Voláteis – ex.: Mercúrio elementar (Hg^0) e o dimetilmercúrio $[(\text{CH}_3)_2\text{Hg}]$;
- Espécies Muito Reativas – ex.: Íon mercúrico (Hg^{2+}) e o cloreto mercúrico (HgCl_2);

- Espécies Pouco Reativas – ex.: Metilmercúrio (CH_3Hg^+) e o sulfeto de mercúrio (HgS).

Além disso, o mercúrio apresenta três estados de oxidação: Hg^{+2} (íon mercúrico), Hg^{+1} (íon mercurioso) e Hg^0 (mercúrio metálico ou elementar) que se transformam entre si no meio ambiente através de reações bióticas e abióticas (Nies, 1999; Morel *et al.*, 1998). O Hg^{2+} forma ligações covalentes bastante estáveis com o carbono dando origem a compostos organometálicos lipossolúveis, ao contrário do Hg^{+1} que praticamente não se liga ao carbono e ao nitrogênio (Barrocas, 2003).

1.2– Acidentes com o Mercúrio

Apesar dos possíveis danos à saúde causados pelo mercúrio serem conhecidos de longa data, grande parte da atenção global dada ao problema da contaminação por esse metal deveu-se aos acidentes que ocorreram no Japão nas décadas de 1950 e 1960. Em ambos os casos, a contaminação humana ocorreu em consequência à poluição de sistemas aquáticos por metilmercúrio. Sendo um deles na Baía de Minamata, na costa do Mar Shiranui e o outro na Bacia do Rio Agano. Cerca de 3.000 pessoas apresentaram sintomas que foram atribuídos a uma doença que mais tarde foi chamada de “Doença de Minamata” ou “Mal de Minamata”. Na verdade, estima-se que o número de pessoas que foram contaminadas por metilmercúrio seja muito maior (Ross, 1996; Honda *et al.*, 2006). A Doença de Minamata é definida como o envenenamento humano por metilmercúrio e tem sintomas parecidos com a síndrome de Hunter-Russell. Além dos casos de envenenamento direto por metilmercúrio, houve também a transmissão congênita da Doença de Minamata. Ao longo do tempo, foi observado o aumento considerável do número de bebês recém-nascidos com problemas neurológicos. Essas desordens foram atribuídas à exposição materna ao metilmercúrio durante a gravidez (Eto, 1997; Honda *et al.*, 2006; Ekino *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009).

Embora o acidente envolvendo mercúrio de maior repercussão mundial tenha ocorrido no Japão, o acidente mais grave foi no Iraque, na década de 1970, onde foram registrados cerca de sete mil casos de envenenamento. A causa dessa tragédia que culminou com a morte de mais de 450 pessoas foi o consumo de sementes de trigo contaminadas com metilmercúrio. O uso do metilmercúrio, neste caso, foi para evitar o crescimento de fungos em sementes destinadas ao plantio (Bakir *et al.*, 1973; Barrocas, 1994).

No Brasil, o problema da contaminação por mercúrio tornou-se bastante conhecido pela comunidade internacional devido à corrida para produção de ouro na região amazônica durante a década de 1980. Aproximadamente 30% do mercúrio usado para formação de amálgamas com o ouro são perdidos durante o processo, contaminando os corpos d'água (Malm *et al.*, 1990). Além da contaminação aquática, quando a amálgama que o mercúrio faz com o ouro é aquecida há liberação de vapor de mercúrio para a atmosfera. Durante muitos anos, as elevadas concentrações de mercúrio nesse ecossistema foram relacionadas à atividade garimpeira (Malm *et al.*, 1990; Lacerda & Pfeiffer, 1992; Hacon *et al.*, 2008). Porém, alguns pesquisadores defendem a hipótese de que existem fontes naturais de mercúrio no solo amazônico e por isso, são detectados níveis elevados de mercúrio na população e na biota da região (Roulet & Lucotte, 1995).

Na Baía de Guanabara, foram detectadas elevadas concentrações de mercúrio próximo à desembocadura do rio São João de Meriti (Barrocas, 1994; Wasserman *et al.*, 2000). Porém, a biota da Baía de Guanabara apresenta níveis

de mercúrio baixos e aceitáveis para o consumo, de acordo com a legislação brasileira. Esse fato pode estar relacionado às condições eutróficas e redutoras desse ecossistema aquático. Nesse caso, tanto o metilmercúrio quanto o mercúrio inorgânico encontram-se adsorvidos ao material particulado. Isso reduz o tempo de residência do mercúrio na coluna d'água e a biodisponibilidade desse elemento (Kehrig *et al.*, 2002).

Programas de proteção ambiental, internacionais e nacionais, têm ressaltado a importância da restrição do uso de compostos mercuriais em diversas atividades, como por exemplo, na mineração de ouro. Entretanto, mesmo com a proibição do uso do mercúrio em alguns locais, as características físico-químicas deste metal fazem com que ele seja transportado para locais distantes de suas fontes naturais ou antropogênicas (Bozongo *et al.*, 2003). A ampla distribuição do mercúrio na biosfera, mesmo sob condições naturais, faz com que este elemento seja classificado como um poluente global (Mason *et al.*, 1994; Mason *et al.*, 1996; Zagar *et al.*, 2007).

1.3- O Metabolismo e a Toxicidade do Mercúrio

Dentro do grupo de contaminantes ambientais, os metais pesados merecem grande destaque devido à alta persistência destes elementos no meio ambiente e aos efeitos nocivos que causam à saúde de populações expostas. O mercúrio pode ser considerado o metal pesado de maior potencial tóxico graças a sua capacidade de bioacumulação em organismos e de biomagnificação na cadeia trófica. A toxicidade do mercúrio está relacionada à capacidade da sua forma catiônica, Hg^{+2} , de ligar-se aos grupos sulfidril, tioéter e imidazol presentes em enzimas e proteínas que desempenham funções vitais nos organismos, tornando-as inativas (Horn *et al.*, 1994; Gupta & Ali, 2004). Além disso, o mercúrio causa alterações nos sistemas de transporte intracelulares (Osborn *et al.*, 1997; Nies, 1999). As formas orgânicas do mercúrio são acumuladas em tecidos de organismos e assim, são transferidas para níveis superiores da cadeia trófica com grande eficiência (Mason *et al.*, 1996).

Podemos considerar que a absorção da forma líquida do mercúrio elementar (Hg^0) pelo organismo humano é baixa, porém a toxicidade da forma gasosa é elevada podendo causar pneumonia intersticial aguda quando é inalado em altas concentrações. Cerca de 80% do mercúrio gasoso inalado é absorvido pelo sangue e alcança com facilidade o cérebro através da barreira hemato-encefálica atingindo e danificando as células do sistema nervoso central (Honda *et al.*, 2006).

Com o tempo, o mercúrio elementar que foi absorvido pelo corpo é oxidado e é acumulado nos rins. A absorção do Hg^{+2} no trato digestivo é baixa, mas em grandes concentrações pode causar desordens que levam à morte. Já o metilmercúrio é facilmente absorvido pelo trato digestivo e entra no sistema nervoso central após passagem pela barreira hemato-encefálica causando degeneração e disfunção dos neurônios. Os sintomas da Doença de Minamata envolvem desordens sensoriais das quatro extremidades, ataxia cerebelar, comprometimento do campo visual, do olfato e da audição (Hacon *et al.*, 2008).

Mais de 90% do mercúrio encontrado em peixes e em outros organismos marinhos estão na forma de metilmercúrio (Mason *et al.*, 1996; Barkay *et al.*, 2003). Geralmente, a maior via de exposição humana ao mercúrio é através do consumo destes alimentos. O transporte do metilmercúrio pelos tecidos é mediado por uma conjugação entre o metilmercúrio e uma cisteína que o transporta para o interior da célula por uma proteína carreadora. Em gestantes, o risco da contaminação por mercúrio é ainda maior. O cérebro do feto em desenvolvimento é muito sensível ao metilmercúrio e, além disso, a concentração de metilmercúrio no sangue do feto pode ser até duas vezes maior do que no sangue materno já que a placenta transporta ativamente metilmercúrio para o feto (Honda *et al.*, 2006; Hacon *et al.*, 2008; Câmara *et al.*, 1996).

1.4– O Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio

O uso crescente do mercúrio pelo homem em diversas atividades tem provocado sensíveis alterações no ciclo biogeoquímico do mercúrio que conseqüentemente aumentam a exposição humana aos efeitos nocivos deste poluente. Esse motivo, para avaliar a contaminação ambiental por mercúrio é fundamental conhecer a ciclagem deste elemento (Figura 1 e Quadro 1).

Atividades antropogênicas, como a mineração de ouro e prata, queima de combustíveis fósseis e incineração de resíduos urbanos, são responsáveis por até 60% do mercúrio encontrado na atmosfera, afetando significativamente seu ciclo global (Batten & Scow, 2003).

Apenas um terço do mercúrio encontrado, atualmente, no meio ambiente é proveniente de fontes naturais (Morel *et al.*, 1998). Porém, os estudos feitos até a primeira metade da década de 1980 apontavam as fontes geológicas naturais como causa principal para a ocorrência de mercúrio em locais remotos. Apenas com o avanço das técnicas de análise de metais traço no ambiente foi possível aferir com precisão a magnitude da emissão e da deposição do mercúrio provocada por ações antrópicas (Fitzgerald *et al.*, 1998).

O tempo de residência atmosférica do mercúrio elementar é de aproximadamente um ano, dessa forma o mercúrio pode ser transportado para áreas remotas, distantes de suas fontes naturais ou antropogênicas. Essa

propriedade do mercúrio contribuiu para que esse elemento químico fosse considerado um poluente de importância global (Gustin *et al.*, 1996). Aproximadamente de 95% do mercúrio, presente na atmosfera encontra-se na forma elementar (Hg^0). A oxidação dessa espécie química a Hg(II) ocorre lentamente, na maioria das vezes, devido à presença de nevoeiros e de nuvens com gotículas de água. O ozônio é, provavelmente, o oxidante mais importante nesse processo, juntamente com o HClO , HSO^{-3} e OH . Parte do Hg(II) produzido na atmosfera pode ser reduzido a sua forma elementar, provavelmente, na presença de SO^{-3} ou por foto-redução (Morel *et al.*, 1998).

O vapor de mercúrio elementar presente na atmosfera está sujeito a diferentes reações de oxidação. Através das chuvas e da neve, o Hg(II) da atmosfera é depositado na água ou no solo e assim, pode ser novamente reduzido ao estado elementar, prevenindo que o mesmo vá para regiões anóxicas de corpos d'água e seja metilado (Barkay *et al.*, 2003). Dessa forma, a atmosfera e a água mantêm uma relação estreita na ciclagem do mercúrio, baseada em reações de redução e oxidação.

Os ecossistemas aquáticos, geralmente, encontram-se supersaturados de mercúrio elementar (Hg^0), na sua forma aquosa, quando comparados à massa de ar que os cobre. Por isso, ocorre um fluxo contínuo de Hg^0 em direção atmosfera, que pode variar sua intensidade de acordo com fatores como a localização geográfica, concentração de carbono orgânico dissolvido e radiação solar (Morel *et al.*, 1998; Bonzongo & Donkor, 2003).

A deposição do mercúrio na superfície da Terra ocorre por precipitação úmida ou seca no estado Hg(II) contaminando solos, lagos e mares distantes de suas fontes naturais ou antropogênicas. No oceano, a maior parte do Hg(II) é reduzida a mercúrio elementar, que se volatiliza e retorna a atmosfera. Apenas uma pequena parte é transportada em direção ao sedimento, onde diversas reações químicas e biológicas ocorrem dando continuidade ao ciclo do mercúrio (Morel *et al.*, 1998). Em águas superficiais, o mercúrio iônico é encontrado na maioria das vezes complexado aos íons hidróxido e cloreto (ex.: Hg(OH⁻), Hg(OH)₂, HgCl⁺, HgClOH, HgCl₂). Além disso, parte do Hg(II) é encontrada ligada ao sulfeto (S²⁻) e aos ácidos húmicos quando estão presentes (Morel *et al.*, 1998). Em águas anóxicas, acredita-se que a redução do mercúrio ocorra devido à presença de substâncias húmicas, principalmente, em águas de pH em torno de 4,5 e onde íons cloreto são ausentes (Morel *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2009).

A redução do mercúrio iônico em sua forma elementar ocorre por meio de processos abióticos e bióticos, podendo ser observada em ecossistemas aquáticos, na atmosfera e no solo (Morel *et al.*, 1998; Wasserman *et al.*, 2003). O processo biótico para redução do Hg(II) é mediado por populações bacterianas que apresentam um mecanismo específico de resistência ao mercúrio baseado no operon-*mer* de resistência ao mercúrio, mais especificamente no gene *merA* (Mason *et al.*, 1995; Barkay *et al.*, 2003). A eficiência do mecanismo abiótico de foto-redução depende dos níveis de Hg(II) disponíveis, do comprimento de onda da radiação solar e da sua intensidade (Morel *et al.*, 1998).

A oxidação do mercúrio elementar em ambientes aquáticos foi durante muito tempo considerada inexistente ou irrisória. Atualmente, sabe-se que na água do mar, devido às altas concentrações de cloreto, a oxidação do mercúrio elementar ocorre em taxas significativas, tendo o oxigênio como oxidante (Morel *et al.*, 1998; Bargagli *et al.*, 2007).

Na natureza, a forma mercurial mais observada é a inorgânica (Barkay *et al.*, 2003). Entretanto, é o metilmercúrio (uma das formas orgânicas do mercúrio) que desperta grande preocupação devido a sua capacidade de biomagnificação entre os organismos aquáticos e seu potencial tóxico (King *et al.*, 2002). A formação do metilmercúrio consiste na transferência de um grupo metil proveniente de algum composto orgânico ao mercúrio iônico. Essa reação ocorre por meio de processos fotoquímicos e através da ação de microorganismos (Morel *et al.*, 1998). O mercúrio inorgânico atmosférico é depositado em meio aquático e a metilação pode ocorrer em camadas anóxicas da coluna d'água ou no sedimento (Ekstrom *et al.*, 2003). Acredita-se que a transformação bacteriana do Hg^{2+} em CH_3Hg^+ (metilmercúrio) consiste em um mecanismo de detoxificação já que o CH_3Hg^+ é mais lipossolúvel que o Hg^{2+} , sendo mais facilmente retirado da célula bacteriana (Osborn *et al.*, 1997; Batten & Scow, 2003).

Estudos em ambientes marinhos e dulcícolas apontam as bactérias sulfato-redutoras como as maiores responsáveis pela formação de metilmercúrio. As bactérias sulfato-redutoras utilizam o sulfato (SO_4^{-2}) como receptor final de elétrons no processo de respiração o qual tem sido relacionado com a metilação do mercúrio (King *et al.*, 2002). Essa relação tem base em pesquisas envolvendo

o uso de um inibidor específico da redução do sulfato, o molibdênio. Na presença desse agente inibidor a formação de metilmercúrio foi suprimida. As bactérias sulfato-redutoras mediam a metilação do mercúrio inorgânico em sedimentos e liberam para o meio ambiente sulfeto como produto do processo respiratório. A metilação ocorre dentro da célula bacteriana através da ação da enzima metiltransferase que transfere o grupo metil da metilcobalamina (vitamina B₁₂) para o mercúrio iônico. O mecanismo que ocorre para entrada do mercúrio na célula bacteriana ainda é desconhecido (Benoit *et al.*, 1999; Barkay *et al.*, 2003).

A degradação do metilmercúrio pode ocorrer por mecanismos fotoquímicos ou por ação de enzimas bacterianas (Morel *et al.*, 1998; Barkay *et al.*, 2003). A degradação abiótica do metilmercúrio ocorre na presença de luz solar, principalmente radiação UV-A e UV-B, podendo variar conforme a intensidade da radiação. Sendo assim, em ambientes expostos à luz e com baixas concentrações de mercúrio a foto-degradação do metilmercúrio é freqüente (Barkay *et al.*, 2003).

A resistência bacteriana ao metilmercúrio deve-se à presença do gene *merB* no operon-*mer* de resistência ao mercúrio. Esse gene codifica a enzima organomercúrio-liase capaz de romper a ligação entre carbono e mercúrio (C – Hg) presente no metilmercúrio, originando CH₄ e Hg(II) (Schaefer *et al.*, 2004).

O metilmercúrio pode ser degradado por demetilação redutiva, resultando em CH₄ e mercúrio elementar por ação do operon-*mer* bacteriano ou degradado por demetilação oxidativa resultando em CO₂, uma pequena parcela de CH₄ e, possivelmente, em Hg(II) por ação de bactérias anaeróbicas. O mecanismo de demetilação oxidativa ainda é desconhecido, mas ao contrario da demetilação

mediada pelo operon-*mer* acredita-se que libera para o meio ambiente Hg(II) o qual pode ser substrato novamente para metilação (Barkay *et al.*, 2003).

Quadro 1 - Transformações mercuriais durante o ciclo biogeoquímico do mercúrio (Adaptação de Barkay *et al.*, 2003).

| Processo | Tipo | Mecanismo |
|-----------------------------|----------|---|
| Metilação do Hg (II) | Biótico | Transferência do grupo metil pelas bactérias sulfato-redutoras |
| | Abiótico | Metilação através de compostos orgânicos |
| Demetilação | Biótico | Demetilação redutora através dos genes <i>merA</i> e <i>merB</i> Demetilação oxidativa |
| | Abiótico | Fotodegradação |
| Redução do Hg (II) | Biótico | Bactérias redutoras (gene <i>merA</i>) e mecanismos pouco conhecidos de algas |
| | Abiótico | Reações fotoquímicas |
| Oxidação do Hg ⁰ | Biótico | Oxidação por hidroxiperoxidas de microorganismos, plantas e animais |
| | Abiótico | Fotooxidação |

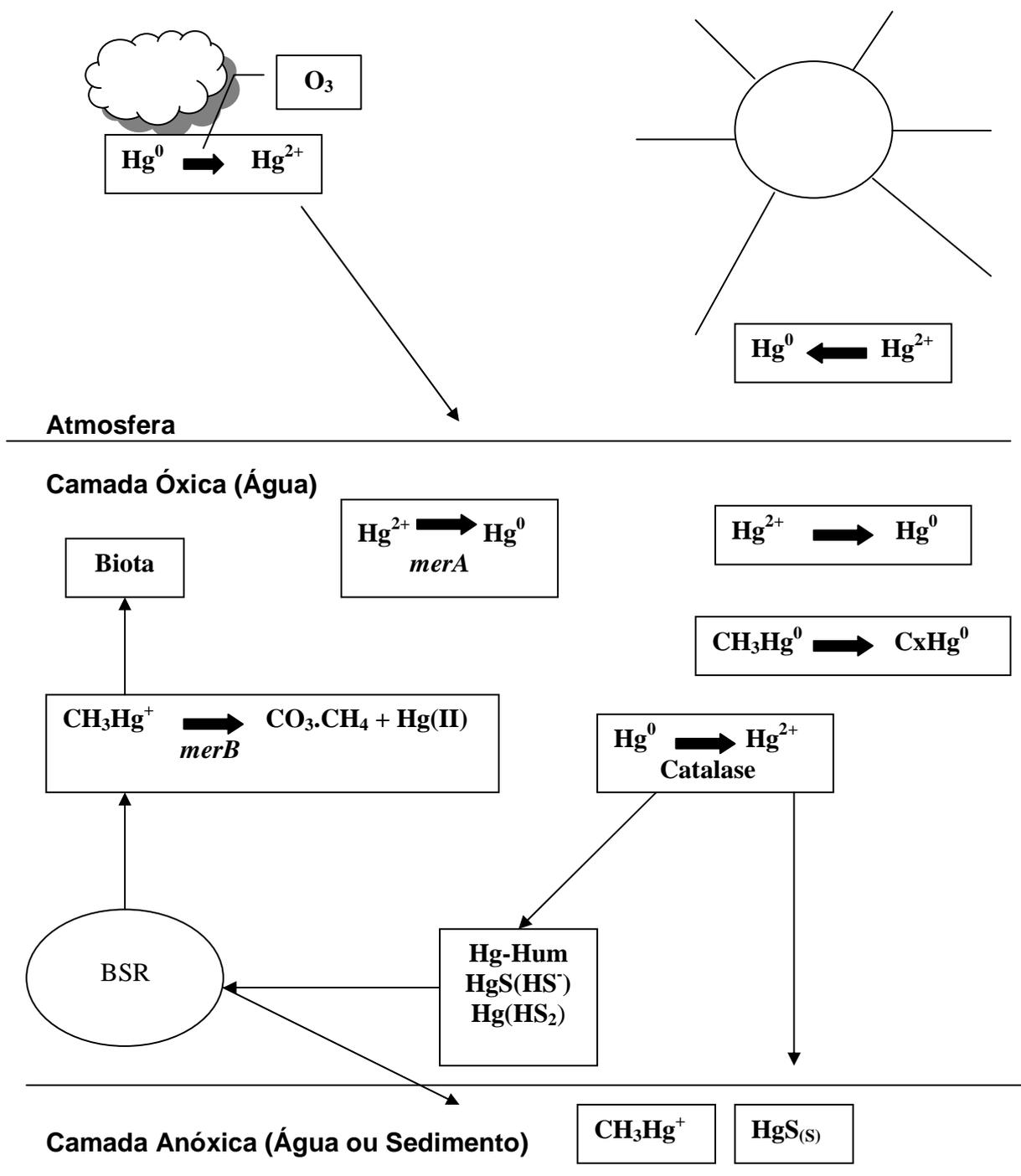


Figura 1 - Esquema representando o Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio.

BSR = Bactérias Sulfato-Redutoras. *merA* / *merB* referem-se a atividade dos genes que codificam a proteína mercúrio redutase e organomercurio liase, respectivamente (Baseado em Barkay *et al.*, 2003).

1.5– A Resistência Bacteriana ao Mercúrio

Alguns metais são essenciais para o metabolismo dos organismos, participando de reações bioquímicas importantes, como o potássio, o sódio e o cálcio. Porém, outros metais não apresentam qualquer função biológica conhecida e dentro da célula podem formar compostos complexos com grande potencial tóxico como os íons Hg^{2+} , Cd^{2+} e Ag^{2+} (Nies, 1999).

Uma vez dentro da célula, metais tóxicos podem inativar enzimas vitais, alterar sistemas de transporte intracelular e competir com íons de importância fisiológica (Osborn *et al.*, 1997). O potencial tóxico de vários íons metálicos contribuiu para que ao longo do processo evolutivo fossem desenvolvidos mecanismos bacterianos de homeostase e de resistência a metais (Nies, 1999).

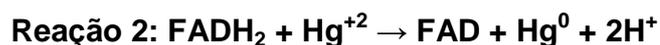
Foram identificados cinco tipos de mecanismos de resistência ou de tolerância ao mercúrio e seus compostos, são eles (Osborn *et al.*, 1997):

- (1) Redução da entrada de Hg^{2+} pela redução da permeabilidade celular;
- (2) Demetilação do metilmercúrio.
- (3) Produção de dimetilmercúrio a partir da redução dissimilativa do sulfato;
- (4) Produção de metilmercúrio;
- (5) Redução enzimática do Hg^{2+} em Hg^0 .

A redução enzimática do Hg^{2+} em Hg^0 é o mecanismo de resistência ao mercúrio mais estudado (Figura 2). Essa resistência ocorre devido à presença do operon de resistência ao mercúrio, o operon-*mer*, o qual é comumente encontrado em transposons (ex.: Tn501, Tn5041, Tn5053, Tn5056 e Tn21) e em plasmídios (ex.: pKLH2, pDU1358, pMERPH e pPB) (Mindlin *et al.*, 2005; Osborn *et al.*, 1997). O operon-*mer* consiste em um conjunto de genes que codificam polipeptídios responsáveis pelo transporte do íon metálico, regulação do mecanismo de resistência e pela transformação do Hg^{2+} em sua forma menos tóxica (Hg^0). O operon-*mer* pode ser encontrado em bactérias Gram negativas e Gram positivas. Esse mecanismo de resistência já foi observado em bactérias de origem ambiental, humana e animal, em fungos e em leveduras. Praticamente em todos os gêneros de procariontes já foi relatada a presença desse mecanismo de defesa (Osborn *et al.*, 1997; Barkay *et al.*, 2003). Embora os genes de resistência ao mercúrio sejam comumente encontrados em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, existem diferenças nas seqüências desses genes não só quando se compara bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mas também quando comparamos bactérias Gram-negativas entre si. O mesmo vale para bactérias Gram-positivas. Há estudos que defendem o fato de que a resistência bacteriana ao mercúrio seja anterior ao momento da divergência evolutiva que deu origem às bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Helmann *et al.* 1989).

O mecanismo de resistência envolve, inicialmente, a retirada do Hg^{2+} do meio externo à célula, através de um par de cisteínas acoplado a proteína MerP do periplasma bacteriano. Feito isso, o íon mercúrico é transferido para o par de

cisteínas da proteína MerT. As transferências de íons de uma proteína para outra se dá via troca redox. Em seguida, o íon mercúrico é transportado para a face citoplasmática da proteína MerT e então, é passado para o domínio aminoterminal da enzima mercúrio redutase, MerA. O íon mercúrico associado às cisteínas dessa enzima é reduzido a Hg⁰ em uma reação dependente do NADPH (ver reações 1 e 2 abaixo) o qual é o doador de elétrons (Osborn *et al.*, 1997; Barkay *et al.*, 2003).



A forma elementar do mercúrio, Hg⁰, volatiliza com facilidade e assim, quando é liberada no citoplasma, sai da célula na ausência de gastos energéticos com mecanismos de transporte. Para ser detoxificado por redução, mediada por atividade biológica, o potencial redox de um dado metal deve ser entre – 421 mV e + 808 mV (Weast, 1984 *apud* Nies, 1999). O potencial redox do íon mercúrico encontra-se nesta faixa, sendo + 430 mV.

Além da resistência ao mercúrio inorgânico algumas bactérias apresentam resistência ao metilmercúrio (CH₃Hg⁺), forma orgânica do mercúrio. Para isso é necessário que o operon-*mer* contenha em seu conjunto o gene *merB*. O transporte de compostos organomercuriais para o interior da célula bacteriana não depende das proteínas MerP e MerT. Estudos demonstraram que o gene *merB* é

mais comumente encontrado em operons-*mer* de bactérias Gram positivas do que em operons-*mer* de Gram negativas (Barkay *et al.*, 2003).

Sendo assim, é possível classificar os mecanismos de resistência bacteriana ao mercúrio conforme os compostos mercuriais que podem ser detoxificados. Assim temos os mecanismos de resistência de espectro amplo e limitado. O mecanismo limitado é capaz de reduzir o Hg(II) em mercúrio elementar enquanto o mecanismo amplo apresenta no operon-*mer* o gene *merB* e assim, é capaz de detoxificar formas orgânicas do mercúrio através da quebra da ligação Hg-C por protonólise (Narita *et al.*, 2003; Barkay *et al.*, 2003).

O gene *merR* controla a expressão dos outros genes que compõem o operon-*mer*. Quando o Hg(II) está ausente no interior da célula bacteriana, a proteína MerR, codificada pelo gene *merR*, permanece ligada a região do operador/promotor do sistema operon-*mer* inibindo a transcrição dos outros genes pela RNA polimerase. Quando o mercúrio entra na célula liga-se imediatamente a proteína MerR e assim, a transcrição dos genes é ativada. Na presença do mercúrio a proteína MerR muda sua conformação permitindo que a enzima RNA polimerase transcreva os genes. Quando a entrada de mercúrio na célula cessa e não há mais átomos de mercúrio para se ligarem a proteína MerR, a transcrição dos genes é interrompida já que uma proteína MerR livre, liga-se novamente a região do operador/promotor do sistema. (Osborn *et al.*, 1997).

Além dos genes já citados, existem outros que nem sempre são observados em operons-*mer* de resistência ao mercúrio, sendo considerados opcionais, são eles: *merC*, *merE* e *merF*, que participam do transporte do mercúrio; *merD*, o

segundo gene regulador e *merG*, responsável pela resistência ao fenilmercúrio (Narita *et al.*, 2003).

Os mecanismos de resistência estão, na maioria das vezes, localizados em elementos genéticos móveis, que permitem sua transferência horizontal. A ocorrência da transferência de material genético entre os microrganismos é conhecida há quase 50 anos, seja por transdução (transferência mediada por bacteriófagos), transformação (captação de DNA extracelular) ou conjugação (transferência a partir do contato direto entre as células doadoras e receptoras) (Barkay *et al.*, 1993).

É muito relevante a transferência gênica na ecologia das comunidades microbianas, pois possibilita que as funções metabólicas dos microrganismos sejam alteradas. Os genes relacionados à sobrevivência e multiplicação microbiana nesses ambientes costumam apresentar simultaneamente a resistência a antibióticos e metais pesados (Barkay *et al.*, 1993; Lilley *et al.*, 1996).

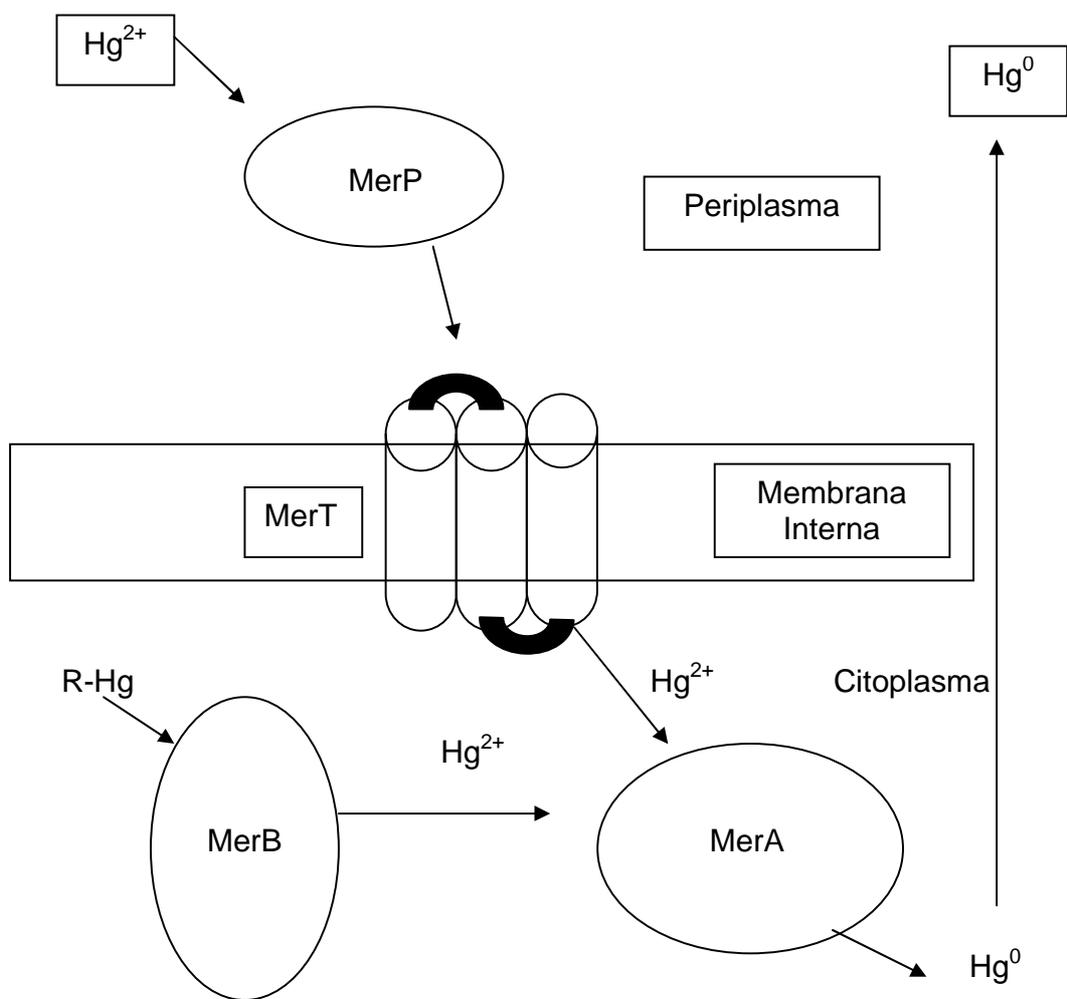


Figura 2 – Esquema representando o mecanismo enzimático de redução do Hg^{2+} ao Hg^0 (Baseado em Osborn *et al.*, 1997)

Um plasmídio apresentando o operon-*mer* de resistência bacteriana ao mercúrio foi identificado pela primeira vez em *Escherichia coli* (Kiyono *et al.*, 1995 *apud* Osborn *et al.*, 1997). Hoje em dia, sabe-se que bactérias Gram-negativas e Gram-positivas podem apresentar esse mecanismo o qual tem distribuição geográfica mundial (Osborn *et al.*, 1997). Porém, a maioria dos estudos sobre resistência bacteriana ao mercúrio envolve apenas as Gram-negativas. Nesse grupo, os operons-*mer* são comumente encontrados em plasmídios e em transposons, indicando a alta mobilidade desses elementos. Porém, também já foram identificados em cromossomos. Além disso, em bactérias Gram negativas as seqüências dos genes *mer A*, *R*, *T* e *P* apresentam similaridade significativa ao contrário do que ocorre em bactérias Gram-positivas (Hart *et al.*, 1998). A resistência bacteriana ao mercúrio tem sido relacionada aos genes de resistência aos antibióticos e apresentam distribuição mundial similar (Ojo *et al.*, 2004).

A distribuição global dos genes de resistência bacteriana ao mercúrio em plasmídios e transposons reflete principalmente o impacto da poluição urbana e industrial (Mindlin *et al.*, 2005). As comunidades microbianas nativas respondem aos efeitos da poluição ambiental desenvolvendo mecanismos de resistência ou maneiras de degradar compostos tóxicos (Barkay *et al.*, 1985). Entretanto, a resistência bacteriana ao mercúrio já foi observada em bactérias provenientes de locais sem histórico de contaminação mercurial (Hart *et al.*, 1998).

0.0- CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO PARA A SAÚDE PÚBLICA

Tendo em vista a ubiquidade da contaminação ambiental por mercúrio e a severidade dos danos à saúde que o mercúrio pode causar, torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos que visem reduzir a exposição de populações humanas ao mercúrio. Recentemente, um novo processo para remediação da contaminação por mercúrio em efluentes industriais tem sido avaliado em escala técnica. Este método baseia-se no mecanismo de resistência bacteriana ao mercúrio, mediado pelo operon-*mer*. Esse método de biorremediação consiste basicamente na imobilização de uma população bacteriana resistente ao mercúrio em um substrato inerte no interior de um biorreator por onde o efluente industrial contaminado será conduzido. Esta técnica apresentou grande eficiência já que 99% do mercúrio contaminante foi removido através do processo de redução do Hg(II) em mercúrio elementar. O produto da redução bacteriana acumula-se junto ao substrato inerte podendo, mais tarde, ser reutilizado (Wagner-Dobler *et al.*, 2000).

Atualmente, após décadas de estudos sobre o funcionamento do mecanismo bacteriano de resistência ao mercúrio e o recente desenvolvimento de técnicas moleculares, possuímos as ferramentas e o conhecimento técnico-científico adequado para a aplicação desta abordagem inovadora a esse grave problema ambiental com relevantes implicações na saúde pública.

A hipótese deste estudo é que a redução enzimática do Hg(II) a mercúrio elementar é o principal mecanismo de resistência bacteriana e que esse processo diminui a biodisponibilidade do mercúrio. Isso seria decorrente, tanto da formação de uma espécie de baixa toxicidade, o mercúrio elementar, quanto da diminuição do *pool* do íon mercúrico disponível para formação do metilmercúrio.

A Organização Mundial da Saúde define saneamento como o controle de fatores que atuam sobre o meio ambiente e que exercem, ou podem exercer, efeitos prejudiciais ao bem-estar físico, mental ou social do homem (Heller, 1998). Portanto, é neste contexto que a presente proposta de trabalho se insere, uma vez que tem como meta final o uso das cepas bacterianas obtidas para o controle ou a mitigação dos efeitos danosos causados pela contaminação ambiental pelo mercúrio. Assim, em última análise, os resultados visam contribuir para a redução da exposição humana ao mercúrio e de seus efeitos prejudiciais à saúde.

3.0 - OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo o isolamento e a identificação de cepas bacterianas resistentes / tolerantes ao mercúrio provenientes de diversos ecossistemas aquáticos brasileiros, visando à realização de bioensaios para quantificação do processo de redução biológica do Hg(II) em sua forma elementar (Hg⁰).

3.2 – Objetivos Específicos

- Determinar uma Concentração de Mercúrio Mínima Seletiva (CMS) visando o isolamento de cepas bacterianas tolerantes / resistentes ao mercúrio;
- Avaliar a influência da composição do meio de cultura e da adição de quelantes ao meio na biodisponibilidade e na susceptibilidade bacteriana ao mercúrio;

- Isolar cepas bacterianas tolerantes / resistentes ao mercúrio em diferentes ecossistemas aquáticos brasileiros;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio (MIC) para avaliação do nível de resistência ao mercúrio dentre as cepas isoladas;
- Avaliar a resistência bacteriana a antibióticos em cepas bacterianas com nível de resistência elevado;
- Identificar as cepas bacterianas com nível de resistência elevado;
- Investigar a presença do gene *merA* em cepas bacterianas com nível de resistência elevado;
- Quantificar a redução biológica do Hg(II) ao estado elementar realizada pelas cepas bacterianas resistentes com nível de resistência elevado.

4.0- MATERIAL & MÉTODOS

4.1 – Áreas de Estudo e Coleta das Amostras Ambientais

4.1.1 – Áreas de Estudo

Foram coletadas amostras de água em diferentes ecossistemas aquáticos de estados brasileiros (Rio de Janeiro, Rondônia, Mato Grosso). Os locais escolhidos são muito distintos entre si sob diversos aspectos (geográficos, climáticos, ecológicos, níveis de contaminação / degradação ambiental e histórico de ocupação humana). As justificativas para a escolha destes ecossistemas foram a facilidade de acesso e obtenção das amostras e a intenção de testar a hipótese da ubiquidade da presença de bactérias resistentes ao mercúrio em ecossistemas aquáticos, mesmo em sistemas não impactados (Figura 3).

No estado do Rio de Janeiro, as amostras de água foram coletadas em diferentes pontos ao longo da Bacia da Baía da Guanabara. Foram coletadas amostras em rios que desembocam na baía como os rios Acari e São João de Meriti, em pontos próximos a entrada da baía e à cidade de Niterói. No estado de Rondônia, foram coletadas amostras de água ao longo do Rio Jamari, que faz parte da Bacia do Rio Madeira. No estado do Mato Grosso, as amostras de água foram coletadas em diferentes pisciculturas do município de Alta Floresta.

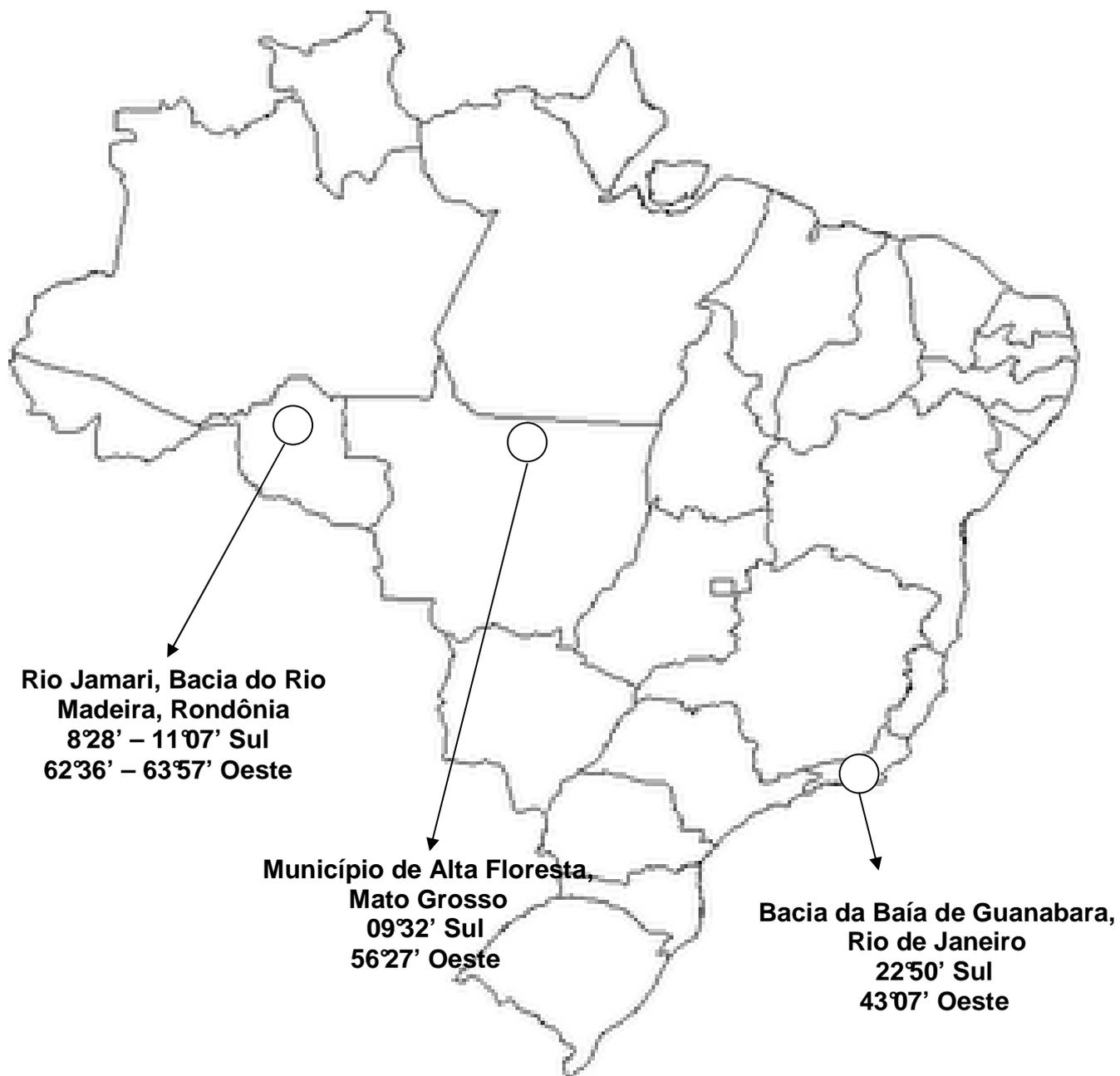


Figura 3 - Mapa do Brasil destacando os locais de coleta de amostra ambientais.

4.1.2 – Coleta das Amostras de Água

Para isolamento de cepas bacterianas resistentes ao mercúrio, foram coletadas amostras de água, seguindo a metodologia proposta por Ramaiah & De (2003) com algumas alterações. As amostras de água foram obtidas através de seringas de 60 mL (BD / EUA) acopladas a suportes de filtração (Millipore / EUA) contendo uma membrana de éster celulose, com porosidade de 0,22 μm e 47 mm de diâmetro, capaz de reter as células bacterianas presentes nas amostras de água. Após a filtração das amostras de água, os suportes de filtração foram mantidos sob refrigeração adequada (5°C) até a chegada ao laboratório. Todo o material usado para coleta das amostras de água foi previamente esterilizado para evitar a contaminação biológica das amostras.

O número de amostras de água coletadas por estado brasileiro variou. No estado do Rio de Janeiro foram coletadas 11 amostras de água, em Rondônia foram coletadas 7 amostras e em Mato Grosso foram coletadas 4 amostras.

4.2 – Desenvolvimento de uma Metodologia para Isolamento de Bactérias Resistentes ao Mercúrio

4.2.1 - Determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Seletiva

O objetivo deste ensaio foi determinar a mais baixa concentração mercurial capaz de inibir apenas o crescimento de cepas bacterianas sensíveis ao mercúrio, sob condições experimentais específicas. A concentração mercurial obtida através desta experimentação foi utilizada para isolamento de cepas resistentes / tolerantes ao mercúrio provenientes das amostras de água coletadas em diferentes ecossistemas aquáticos brasileiros.

Durante este ensaio foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *E. coli* ATCC 35218 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (resistentes ao mercúrio) e *E. coli* ATCC 23724 e *P. aeruginosa* ATCC 25619 (sensíveis ao mercúrio) (Österblad *et al.*, 1995). O meio de cultura usado foi o Ágar Nutriente (Difco / EUA) e as concentrações de mercúrio (Fluka / EUA) testadas foram 0,0; 0,5; 2,5; 5,0 e 10,0 μM . A semeadura em placas foi realizada a partir de culturas bacterianas crescidas em Caldo Nutriente (Difco / EUA) com densidade de células compatível ao padrão 0,5 da escala de *McFarland*. Após a semeadura em *spots* de 2 μL , as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas e findo este período, foi avaliado o crescimento das cepas. A preparação do inóculo, a

semeadura em placa e as condições de crescimento da cultura foram baseadas na metodologia para determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) proposta por Andrews (2001) com algumas modificações.

4.2.2 - Avaliação da Susceptibilidade Bacteriana ao Mercúrio em Função da Composição do Meio de Cultura

As cepas bacterianas *E. coli* ATCC 35218 (resistente ao mercúrio) e *E. coli* ATCC 23724 (sensível ao mercúrio) foram usadas para avaliar se a susceptibilidade bacteriana ao mercúrio seria alterada em função da composição do meio de cultura. Para esta experimentação foram usados os seguintes meios de cultura: Ágar Nutriente (Difco / EUA), Caldo Nutriente (Difco / EUA), Caldo BHI (Oxoid / Inglaterra) e Ágar BHI (Oxoid / Inglaterra). As concentrações de mercúrio (Fluka / EUA) testadas foram: 0,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 µM. Avaliou-se o crescimento bacteriano em meios de cultura líquidos através da densidade óptica ($D.O_{600nm}$) utilizando espectrofotômetro (Spectrophotometer SP-830 Plus, Barnstead / Turner). As culturas líquidas foram incubadas em banho-maria a 37°C por 24 horas e as leituras em espectrofotômetro ocorreram a cada 2 horas. A semeadura das placas seguiu a mesma metodologia descrita na seção anterior. O

crescimento em meios de cultura sólidos foi avaliado após incubação das placas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

4.2.3 - Avaliação do Efeito do Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA) na Concentração Mínima Inibitória (MIC) de Mercúrio

Foi testado o efeito da adição de DMSA (Sigma / EUA), um agente quelante específico para o mercúrio (Figura 4), no valor do MIC da cepa padrão *E. coli* ATCC 23724, sensível ao mercúrio. Para este experimento, foi empregado o meio de cultura Caldo Nutriente (Difco / EUA) acrescido de mercúrio (Fluka / EUA) na concentração equivalente ao MIC (10 µM de Hg), determinado anteriormente para esta cepa. As concentrações de DMSA testadas foram: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mM. O crescimento no meio líquido foi medido em espectrofotômetro seguindo as condições já descritas.

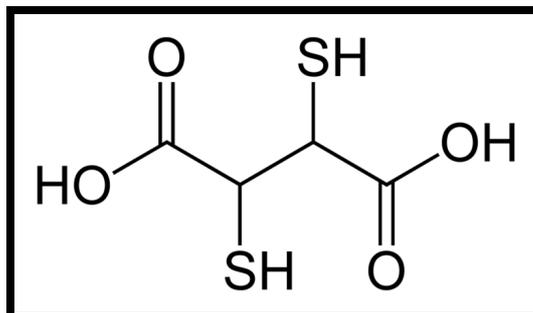


Figura 4 - Estrutura química do Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA).

4.2.4 - Isolamento das Cepas Resistentes ao Mercúrio

No laboratório, os suportes de filtração foram abertos em ambiente estéril. Em seguida, as membranas foram removidas utilizando uma pinça e transferidas para tubos do tipo Falcon contendo 50 mL de Caldo Nutriente (Difco / EUA) com 5 μ M Hg (Fluka / EUA). A escolha desta concentração mercurial baseou-se nos experimentos anteriores realizados com as cepas ATCC (descritos na seção 9.1.1). Após 24 horas de incubação dos tubos em estufa bacteriológica a 37°C, as culturas em meio líquido foram usadas para semeadura de placas contendo Agar Nutriente (Difco / EUA) com 5 μ M Hg (Fluka / EUA). Na seqüência, as placas foram incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C e findo este período, foi feita a verificação do crescimento de colônias resistentes (Figura 5).

Os tempos de incubação das culturas em meio líquido e em placas foram expandidos até 48 horas nos casos em que 24 horas de incubação não foi tempo suficiente para o crescimento bacteriano. Os critérios para seleção de colônias nas placas foram: priorizar colônias que apresentassem diferentes aspectos macromorfológicos entre si e refletir proporcionalidade em relação a sua representatividade em cada uma das placas semeadas. Feita a seleção, as colônias foram estocadas em Caldo nutriente acrescido de glicerol a 20 % (Invitrogen / EUA) e mantidas em freezer a -20°C e em Ágar Estoque a temperatura ambiente (0,8 g de cloreto de sódio; 1,0 g de Caldo Nutriente; 0,6 g de Bacto Ágar; 100 mL de água destilada; pH 7,2 - 7,4) até a realização dos próximos experimentos. Geralmente, foram isoladas de cada uma das placas de 3 a 5 colônias.

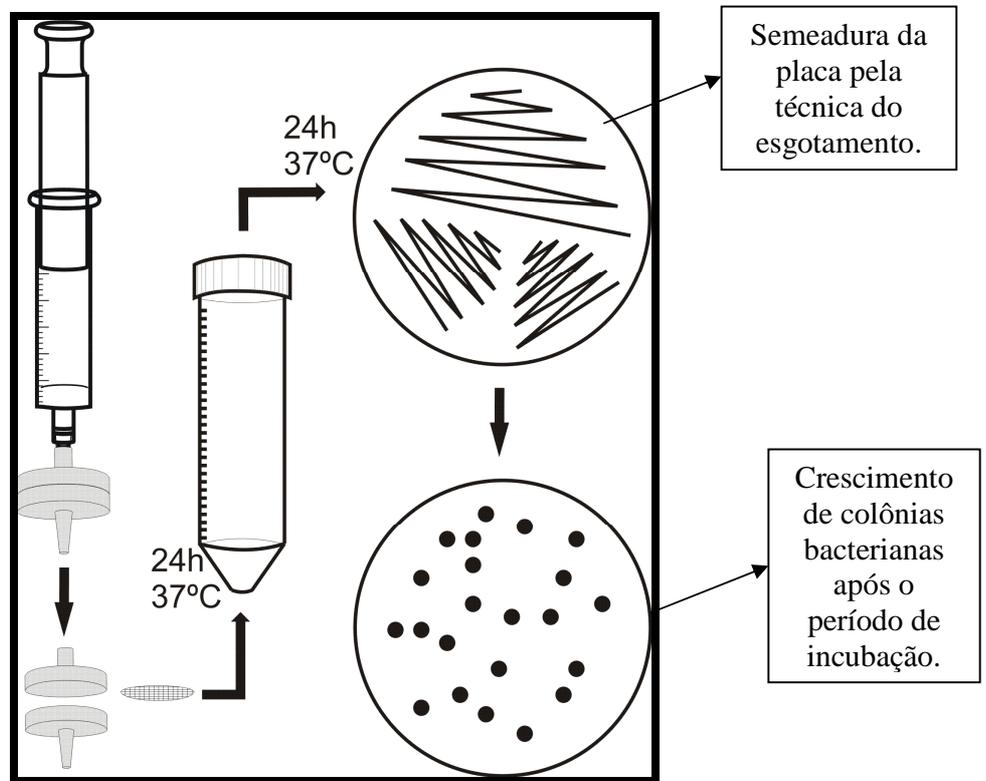


Figura 5 - Esquema representando o procedimento para isolamento de cepas resistentes ao mercúrio

4.3 – Determinação da Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio (MIC)

As cepas bacterianas isoladas anteriormente foram expostas a concentrações crescentes deste metal para determinação de sua concentração

mínima inibitória, seguindo a metodologia apresentada por Andrews (2001) com algumas modificações. Inicialmente, foram semeados tubos de ensaio contendo 5mL de Caldo Nutriente (Difco / EUA). Esses tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C até que a densidade de células bacterianas fosse equivalente à escala 0,5 de McFarland. A partir dessas culturas líquidas, foi feita a semeadura em placas de Ágar Nutriente (Difco / EUA) contendo mercúrio. As concentrações mercuriais testadas variaram entre 10 e 40 µM. A semeadura das placas foi feita na forma de *spots* com 2 µL de cultura líquida e em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C.

4.4 – Avaliação da Resistência Bacteriana a Antibióticos

A verificação da resistência a antibióticos foi realizada utilizando a técnica da difusão de disco. A semeadura das placas contendo Ágar Mueller Hinton (Oxoid / Inglaterra) foi realizada a partir de suspensões bacterianas com densidade celular equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland utilizando *swabs* estéreis (NCCLS, 2003). Os discos antibióticos de Ampicilina (10 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Gentamicina (10 µg), Eritromicina (15 µg), Ceftriaxona (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Sulfametoxazol-Trimetoprim (25 µg), Tetraciclina (30 µg), Cefuroxima (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cefotaxima (30 µg) e Cefalotina (30 µg) foram

dispensados sobre a superfície das placas semeadas que posteriormente, foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 horas. Após este período de incubação, foram feitas a leitura das placas e a interpretação dos resultados apresentados. Para controle desta técnica foi utilizada a cepa padrão *E. coli* ATCC 25922. Os critérios de interpretação (NCCLS, 2003) adotados baseados no diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm) foram: Ampicilina: R ≤ 13, I = 14-16, S ≥ 17; Ácido Nalidíxico: R ≤ 13, I = 14-18, S ≥ 19; Gentamicina: R ≤ 12, I = 13-14, S ≥ 15; Eritomicina: R ≤ 13, I = 14-22, S ≥ 23; Ceftriaxona: S ≥ 24; Cloranfenicol: R ≤ 12, I = 13-17, S ≥ 18; Sulfametoxazol-Trimetropim: R ≤ 10, I = 11-15, S ≥ 16, Tetraciclina: R ≤ 11, I = 12-14, S ≥ 15, Cefuroxima: R ≤ 14, I = 15-17, S ≥ 18, Ciprofloxacina: R ≤ 15, I = 16-20, S ≥ 21, Cefotaxima: R ≤ 14, I = 15-22, S ≥ 23, Cefalotina: R ≤ 14, I = 15-17, S ≥ 23.

4.5 - Identificação das Cepas Bacterianas Isoladas

Inicialmente, todas as cepas bacterianas isoladas foram submetidas ao Método de coloração de Gram (Gram, 1884). Porém, apenas as cepas bacterianas que apresentaram valores de MIC superiores a 20 µM Hg foram identificadas ao nível de espécie por meio de kits de identificação comerciais. A partir dos resultados do teste de Gram, foi feita a escolha dos kits de identificação mais

apropriados a cada uma das cepas resistentes. As cepas Gram-negativas foram identificadas ao BD BBL Crystal™ Enteric / Nonfermenter ID kit enquanto que as cepas Gram-positivas foram para identificadas pelo BD BBL Crystal Rapid Gram-positive ID kit.

4.6 - Amplificação do gene *merA*

A extração do DNA genômico das amostras bacterianas foi realizada conforme a metodologia proposta por Sambrook *et al.* (1989). A investigação da presença do gene *merA* foi feita por meio da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) seguindo a metodologia proposta por Liebert *et al.* (1997) com algumas modificações. Devido a grande variabilidade que existe nas seqüências nucleotídicas do gene *merA* em bactérias Gram-positivas, apenas as amostras bacterianas Gram-negativas foram selecionadas para a técnica de PCR. Além disso, também foi critério para seleção de amostras bacterianas o nível de resistência da cepa por isso, apenas as cepas com valores de MIC superiores a 20 µM foram escolhidas.

A mistura de reação para PCR continha 5 U/µL de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen / EUA), tampão de PCR 10x (Invitrogen / EUA), 2 mM de dNTP (Invitrogen / EUA), 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen / EUA) e 10 pmol/µL de cada

iniciador (Invitrogen / EUA), tendo um volume final igual a 50 µL. Os iniciadores usados foram: A1 – ACCATCGGCGGCACCTGCGT (*forward*) e A5 – CCATCGTCAGGTAGGGGAACAA (*reverse*), capazes de amplificar um fragmento de 1238pb durante a reação. As condições ótimas de amplificação incluíram um ciclo inicial de 95°C por 2 minutos, 70°C por 20 segundos, 70°C por 1 minuto; 29 ciclos de 95°C por 1 minuto, 70°C por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos (Eppendorf Mastercycler Personal / Alemanha). As amostras utilizadas como controles da reação foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (resistente ao mercúrio) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23724 (sensível ao mercúrio). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 0,8 % (Invitrogen / EUA) em TBE (0,5x) utilizando como padrão de peso molecular o DNA *Ladder* de 1 Kb (Invitrogen / EUA) e voltagem de 100 V. O gel foi corado em uma solução de 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen / EUA) e visualizado em um sistema de fotodocumentação (UVItec / Reino Unido).

4.7 - Método do Filme de Raios-X para Detecção da Volatilização Bacteriana do Hg(II)

A habilidade das cepas resistentes em reduzir Hg(II) a Hg⁰ foi avaliada qualitativamente pelo método do filme de raios-X, descrito por Nakamura & Nakahara (1988) com algumas modificações. Apenas as amostras bacterianas selecionadas para a técnica da PCR foram usadas neste ensaio.

Inicialmente, estimula-se o operon-*mer* das cepas bacterianas resistentes ao mercúrio isoladas cultivando-as em placas de Ágar Nutriente (Difco / EUA) contendo 5 µM Hg (Fluka / EUA) por 24 horas a 37°C. Depois da incubação, as colônias bacterianas crescidas são removidas com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril e ressuspensas em 50 µL de uma solução de tampão fosfato a 0,07 M (Sigma / EUA) contendo 0,5 mM de EDTA (Sigma / EUA), 0,2 mM de acetato de magnésio (Sigma / EUA), 5 mM de tioglicolato de sódio (Sigma / EUA) e 250 µM Hg (Fluka / EUA). Posteriormente, aplica-se a solução tamponada nos poços de placas do tipo Elisa com o auxílio de uma micropipeta. Em seguida, fixa-se uma folha de filme de raios-X na parte superior da placa (Figura 6). A placa foi incubada por 18 horas, na ausência total de luz, a temperatura ambiente. O vapor de mercúrio elementar (Hg⁰) produzido pelas cepas resistentes forma uma amálgama com a prata presente no filme de raios-X, fazendo com que surjam manchas no filme, que podem ser visualizadas após a sua revelação. Esta experimentação revelará se as cepas isoladas previamente são capazes de expressar o gene *merA* de resistência ao mercúrio, quando são expostas ao metal. Para estes experimentos foram utilizados controles, de forma a assegurar que os resultados obtidos não fossem decorrentes da volatilização abiótica do mercúrio (C1= meio reacional acrescido de Hg sem cepa bacteriana) ou da

volatilização de outra substância proveniente de reações biológicas (C2= meio reacional sem adição de mercúrio com a cepa bacteriana).

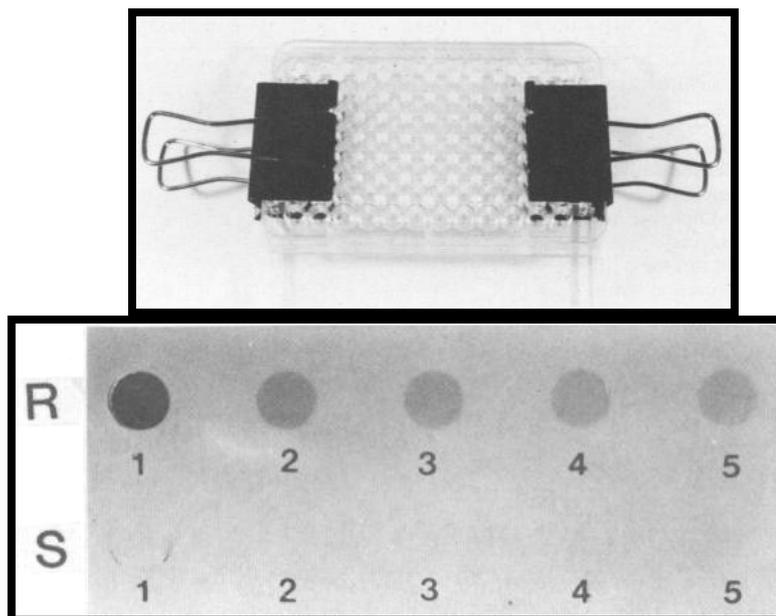


Figura 6 - Fotos da placa Elisa e do filme de raios-X após revelação. Notar o aparecimento de manchas escuras nas áreas referentes às cepas bacterianas resistentes ao mercúrio. (Nakamura & Nakahara, 1988).

4.8 - Ensaio da Redução Bacteriana do Hg(II) em Hg⁰

4.8.1 - Preparo das Células Bacterianas para o Ensaio da Redução

Apenas uma cepa bacteriana resistente ao mercúrio foi escolhida para esta experimentação. Os critérios adotados para a escolha basearam-se no valor do MIC e nos resultados da PCR e do ensaio com filme de raios-X, que indicam não só a presença do gene de resistência, mas também sua expressão.

A partir de uma cultura mantida em Ágar Estoque da cepa resistente ao mercúrio escolhida foi semeada uma placa de Ágar Nutriente (Difco / EUA) contendo 5 μM Hg. Após incubação da placa por 24 horas a 37°C foi feita a verificação do crescimento bacteriano e a partir das colônias crescidas na placa foi feita a semeadura de um tubo com Caldo Nutriente (Difco / EUA) contendo 5 μM Hg. A cultura em meio líquido foi incubada por 24 horas a 37°C. O crescimento bacteriano foi verificado em espectrofotômetro, conforme já foi anteriormente descrito na seção 4.2, até que fosse alcançada a turbidez de células desejada ($\text{D.O}_{600\text{nm}} = 0,576$).

4.8.2 - Quantificação da Redução do Hg(II) em Hg⁰

A formação do mercúrio metálico (Hg⁰) foi acompanhada quantitativamente, utilizando o método proposto por Wiatrowski *et al.* (2006). Neste método, utiliza-se

um sistema composto por dois impingers de vidro Pirex® de 100 mL (SKC / EUA) conectados em série por uma mangueira de silicone. Este sistema é ligado a uma bomba para amostragem de ar (AirChek® 52, SKC / EUA). No primeiro impinger, aplica-se 1 mL da cultura bacteriana resistente ao mercúrio (conforme foi descrito na seção anterior) e 13 mL de Caldo Nutriente contendo mercúrio (Figura 7). Para evitar a contaminação do meio de cultura, foi fixado na parte superior do primeiro impinger um tubo de carvão ativo (SKC / EUA). No segundo impinger, aplica-se uma solução de KMnO_4 acidificada (0,6 % de permanganato de potássio e 5 % de ácido sulfúrico) (Merck / EUA), que tem como função capturar o vapor de mercúrio elementar produzido a partir da redução do Hg(II) . O vapor de mercúrio liberado pela cultura bacteriana resistente será conduzido através de um fluxo contínuo de ar até alcançar o segundo impinger contendo a solução de KMnO_4 . Durante o ensaio de redução, a bomba de amostragem de ar foi ligada por 30 minutos a cada 1 hora com fluxo de ar, pré-estabelecido, de 0,75 L / min. Os sistemas de redução foram montados no interior de uma cabine de segurança biológica para evitar a contaminação biológica das soluções. Para cada experimento foram usados controles, respeitando as mesmas condições descritas acima. As soluções de KMnO_4 e o meio de cultura usado foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio.

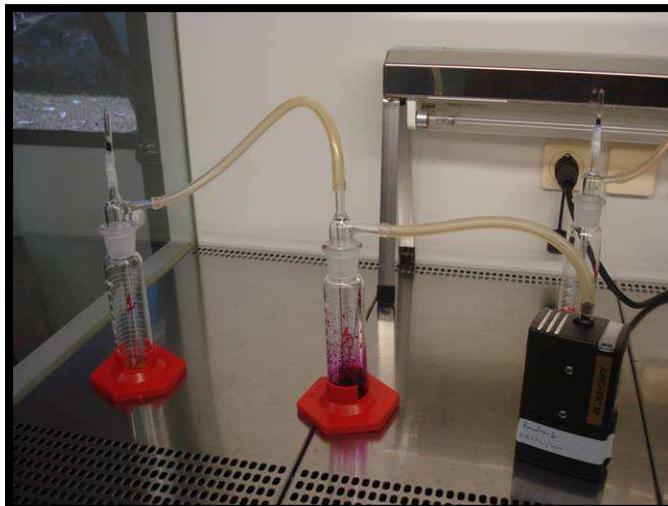


Figura 7 – Foto do sistema de medição da redução do Hg(II) em Hg⁰.

4.8.3 - Condições Experimentais Testadas

Para o ensaio de redução do Hg(II) em Hg⁰ foram testadas diferentes condições experimentais que podem influenciar esta reação biológica: o tempo de incubação, a concentração mercurial no meio de cultura e o inóculo bacteriano inicial.

4.8.3.1 - Tempo de incubação

O objetivo deste ensaio foi avaliar se o tempo de incubação tem influência sobre a redução do Hg(II) em Hg⁰, ou seja, com este ensaio espera-se saber se o percentual de mercúrio reduzido aumenta ao longo do tempo de incubação. Para responder a esta pergunta foram montados quatro sistemas para redução mercurial nos quais foram usados o mesmo inóculo bacteriano (D.O_{600nm} = 0,576), a mesma concentração mercurial (5µM) e quatro diferentes períodos de incubação (1h, 2h, 3h e 4h). Como controle deste ensaio, foi testado o mesmo sistema de redução mercurial sem a bactéria resistente / tolerante ao mercúrio.

4.8.3.2 - Concentração de Mercúrio

O objetivo deste ensaio foi avaliar se o percentual de redução mercurial é alterado em função da concentração de mercúrio presente no meio de cultura. Para responder a esta pergunta foram montados três sistemas para redução mercurial nos quais foram testados o mesmo inóculo bacteriano usado anteriormente (D.O_{600nm} = 0,576), três diferentes períodos de incubação (1h, 2h e 4h) e o dobro da concentração mercurial testada anteriormente (10µM).

4.8.3.3 - Inóculo Bacteriano

O objetivo deste ensaio foi avaliar se o percentual de redução mercurial é alterado em função do número de células bacterianas presentes no meio de cultura. Para responder esta pergunta foram montados sistemas com 5 μM Hg, dois períodos de incubação (1h e 2h) e três inóculos bacterianos iniciais ($D.O_{600\text{nm}} = 0,310; 0,576$ e $0,653$).

4.8.4 - Análise de Mercúrio por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio

Antes da análise, todas as amostras foram digeridas conforme o método 245.1 da EPA. Seguindo essa metodologia, as amostras foram removidas com micropipeta (1,0 mL) e transferidas para tubos de digestão contendo 2,0 mL de uma solução sulfo-nítrica 1:1 (Merck / EUA). Posteriormente, as amostras são aquecidas a 65°C por 1 hora. Após esfriarem, adiciona-se 500 μL de uma solução de permanganato de potássio a 5% (Merck / EUA). O permanganato remanescente deve ser reduzido com uma solução de cloridrato de hidroxilamina a 12% (Merck / EUA) imediatamente antes da análise. As amostras foram diluídas

oito vezes em ácido clorídrico a 2% (Merck / EUA). O limite de detecção do método foi definido como três vezes o desvio padrão de 10 brancos. As soluções de KMnO_4 e o meio de cultura usado foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio (FIMSTM – 400 Perkin Elmer / EUA). O limite de detecção deste aparelho é igual a $< 0,01 \mu\text{g/L}$.

5.0 - RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 – Desenvolvimento de uma Metodologia para Isolamento de Bactérias Resistentes ao Mercúrio

5.1.1 - Determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Seletiva

O uso potencial de cepas bacterianas resistentes ao mercúrio para biorremediação de ambientes contaminados tem despertado o interesse de microbiologistas ambientais (Pike *et al.*, 2002). Por isso, é de fundamental importância que sejam desenvolvidos métodos eficientes para seleção de cepas resistentes ao mercúrio em laboratórios. Embora já existam protocolos padronizados internacionalmente para a determinação da resistência microbiana a antibióticos, ainda não existem métodos para avaliação da resistência a metais (Malik & Jaiswal, 2000; Gadd, 1992). Fazendo uma pesquisa na literatura é possível observar que uma grande variedade de concentrações de mercúrio (na maioria dos casos HgCl_2) foi usada para diferenciar cepas sensíveis de cepas resistentes. Essas concentrações mercuriais variaram desde 7,4 a 125 μM (Nakahara *et al.*, 1977; Zscheck & Murray, 1990; Ávila-Campos *et al.*, 1991; Österblad *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1999; De *et al.*, 2008). Além da importância da determinação de uma concentração de mercúrio específica para seleção de cepas bacterianas resistentes, também é muito relevante a escolha do meio de cultura.

Por isso, um dos parâmetros mais importantes para padronização de um método de avaliação de susceptibilidade de um micro-organismo a uma droga ou a um metal é a composição do meio de cultura usado durante o ensaio. Segundo Pike *et al.* (2002) um meio de cultura para ser apropriado a ensaios de susceptibilidade ao mercúrio deve apresentar algumas particularidades como: suprir os nutrientes necessários ao crescimento do micro-organismo testado, ser capaz de discriminar cepas sensíveis das cepas resistentes ao mercúrio e gerar valores de MIC reprodutíveis.

Durante o presente trabalho, foi desenvolvida uma metodologia para determinação de uma concentração de mercúrio mínima seletiva capaz de inibir apenas o crescimento de cepas bacterianas sensíveis ao mercúrio. No quadro 2, é possível observar que apenas as cepas padrão resistentes ao mercúrio (*E. coli* ATCC 35218 e *P. aeruginosa* ATCC 27853) foram capazes de crescer em meio de cultura Ágar Nutriente contendo 5 μM Hg. Enquanto que as cepas sensíveis (*E. coli* ATCC 23724 e *P. aeruginosa* ATCC 25619) tiveram o crescimento inibido nessa concentração mercurial. As concentrações de mercúrio inferiores a 5 μM (0,5 e 2,5 μM), tanto em meio Caldo Nutriente quanto em meio Ágar Nutriente, não foram suficientes para inibir o crescimento das cepas sensíveis ao mercúrio. Enquanto que em 10 μM Hg todas as cepas bacterianas testadas tiveram seu crescimento inibido, seja em meio líquido ou em meio sólido. Em meio de cultura Caldo Nutriente, não foi possível diferenciar as cepas sensíveis das cepas resistentes mesmo quando adicionamos 5 μM Hg. Isso porque, todas as cepas bacterianas testadas tiveram seu crescimento inibido. Uma das explicações

possíveis para esse fato é que em meio Ágar Nutriente a concentração de ligantes orgânicos é maior do que em meio Caldo Nutriente. Embora esses meios tenham do ponto de vista nutricional a mesma composição (peptona, extrato de carne e extrato de levedura), o meio sólido possui um percentual grande de ágar. Esse componente confere a solidez do meio Ágar Nutriente e pode ter atuado diminuindo a fração de bioativa de mercúrio adicionado ao meio. Diante desses resultados, foi definida a metodologia de isolamento de cepas bacterianas resistentes ao mercúrio presentes nas amostras de água coletadas.

Quadro 2 – Determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Seletiva em Meio de Cultura Ágar Nutriente

| Cepas Padrão Testadas | Concentrações de Mercúrio Testadas | | | | |
|---|------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| | (µM) | | | | |
| | 0,0 | 0,5 | 2,5 | 5,0 | 10,0 |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 (Resistente) | + | + | + | +* | - |
| <i>E. coli</i> ATCC 23724 (Sensível) | + | + | + | -** | - |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (Resistente) | + | + | + | + | - |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619 (Sensível) | + | + | + | - | - |

*Presença de crescimento bacteriano +

** Ausência de crescimento bacteriano -

5.1.2 - Avaliação da Susceptibilidade Bacteriana ao Mercúrio em Função da Composição do Meio de Cultura

De uma maneira geral, a questão da biodisponibilidade de metais em meios de cultura, sejam metais tóxicos ou essenciais, é negligenciada pela maioria dos microbiologistas (Hughes & Poole, 1991). Na maioria dos casos, quando um determinado metal é adicionado a um meio de cultura ele está na forma de um sal. Porém, após essa adição, o metal passa a se apresentar em diversas formas químicas ou espécies que variam de acordo com as propriedades químicas do meio de cultura testado (Farrell *et al.*, 1993). Fatores como pH, Eh, concentração de matéria orgânica e salinidade podem provocar a diminuição da biodisponibilidade de um metal através de processos de complexação e precipitação (Gadd, 1992; Benoit *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2003; Najera *et al.*, 2005). É importante ressaltar que a biodisponibilidade de um metal, ou seja, a sua capacidade de exercer qualquer efeito biológico está intimamente relacionada ao fenômeno da especiação (Hughes & Poole, 1991; Farrel *et al.*, 1993; Golding *et al.*, 2007).

No quadro 3, pode-se observar que os valores de MIC, tanto para a cepa sensível (*E.coli* ATCC 23724) quanto para a cepa resistente ao mercúrio (*E.coli* ATCC 35218), variam de acordo com o meio de cultura utilizado nos experimentos. Nos meios de cultura Ágar BHI e Caldo BHI as concentrações mercuriais que inibem o crescimento das cepas bacterianas testadas são

superiores às concentrações que inibem o crescimento das cepas em Ágar Nutriente e Caldo Nutriente. Quando comparamos os valores de MIC em Caldo BHI com os valores de MIC em Caldo Nutriente notamos que a concentração de mercúrio que inibe o crescimento das cepas testadas em Caldo BHI é quatro vezes maior do que em Caldo Nutriente. Essa tendência também é observada em relação aos meios Ágar Nutriente e Ágar BHI. Nesse caso, o MIC da cepa sensível foi oito vezes maior no meio BHI, enquanto que em relação à cepa resistente não foi possível determinar o MIC de mercúrio com as concentrações testadas. As variações nos valores de MIC em função do meio reforçam a idéia de que esse tipo de ensaio é operacionalmente definido e que a escolha do meio de cultura é de grande importância em ensaios que envolvem metais. Esses resultados foram consistentes entre si e sugerem que tanto no meio Caldo BHI quanto no Ágar BHI ocorreu uma diminuição do mercúrio biodisponível. Uma consequência desse fato é o aumento aparente do nível de resistência ao mercúrio nas cepas testadas, revelado por meio dos valores de MIC apresentados.

Os meios de cultura Caldo BHI e Ágar BHI têm elevado teor protéico (são compostos por infusão de cérebro e coração de bezerro), sendo mais ricos em matéria orgânica do que o Caldo Nutriente e o Ágar Nutriente, que apresentam uma composição mais simples a base de extrato de carne e peptona. Meios de cultura ricos tendem a reduzir a biodisponibilidade de metais como o mercúrio através de sua complexação com ligantes orgânicos (ex: casaminoácidos, extrato de levedura e triptona) presentes em grandes quantidades nestes meios (Ramamoorthy & Kushner, 1975). Resultados semelhantes foram observados por

Pike *et al.* (2002) quando testaram diferentes meios de cultura para determinação do MIC para mercúrio. Grandes variações nos valores de MIC apresentados pela cepa resistente ao mercúrio, *Staphylococcus aureus*, foram observadas quando o meio de cultura testado variou. Por exemplo, em meio de cultura Mueller-Hinton o MIC foi 16 μM Hg, enquanto que em meio BHI e em meio Tryptone Soya (TS) o MIC foi 512 μM Hg. Esse estudo revelou que os valores de MIC nos meios mais ricos em matéria orgânica (BHI e TS) foram cerca de trinta vezes maiores do que em meio Mueller-Hinton.

Quadro 3 – Variação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de mercúrio (μM) em função do meio de cultura utilizado para as cepas sensível e resistente ao mercúrio.

| Meio de Cultura | Cepas Padrão Testadas | |
|-----------------|--|--|
| | <i>E.coli</i> ATCC 23724 Sensível ao Hg | <i>E.coli</i> ATCC 35218 Resistente ao Hg |
| Ágar BHI | 40 μM | N.D. |
| Ágar Nutriente | 5 μM | 10 μM |
| Caldo BHI | 40 μM | 80 μM |
| Caldo Nutriente | 10 μM | 20 μM |

N.D. – não determinado; superior a maior concentração testada (80 μM)

5.1.3 - Avaliação do Efeito do Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA) na Concentração Mínima Inibitória (MIC) de Mercúrio

Em casos de envenenamento humano por metais pesados, é comum, que o tratamento primário consista na administração de quelantes metálicos. Quelantes

como o EDTA (ácido diaminotetraacético), DMPS (1-sulfonato-2,3-dimercaptopropano) e o DMSA (ácido dimercaptosuccínico) foram desenvolvidos especificamente para mobilização efetiva e inativação de metais tóxicos (Rush *et al.*, 2009). Desde 1991, o FDA (*Food and Drug Administration*), órgão governamental norte-americano para controle de drogas e de alimentos, considera o DMSA um agente quelante atóxico e seguro, recomendando seu uso para minimizar os danos à saúde causados por intoxicação não só por mercúrio, mas também por outros metais (Boscolo *et al.*, 2009; Bridges *et al.*, 2009). Diante da ação complexante que o DMSA é capaz de exercer sobre o mercúrio em casos de envenenamento, avaliou-se se a adição desta droga a um meio de cultura pode interferir na ação tóxica que o mercúrio exerce sobre uma cepa bacteriana sensível.

Adições do agente complexante DMSA, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mM, ao meio de cultura Caldo Nutriente contendo 10 μ M de Hg, permitiram o crescimento da cepa *E. coli* (ATCC 23724) sensível ao mercúrio. É importante lembrar que esta concentração de mercúrio, quando adicionada ao meio de cultura Caldo Nutriente, inibiu o crescimento desta cepa em experimentos anteriores (Quadro 2). Portanto, esses resultados indicam que adição de DMSA em determinadas concentrações ao meio de cultura aumentou o valor de MIC desta cepa sensível nestas condições experimentais, sugerindo que a adição de agentes complexantes de fato interfere na fração bioativa de mercúrio em meios de cultura, diminuindo sua biodisponibilidade.

Os resultados deste ensaio de susceptibilidade ao mercúrio, corroboram trabalhos da literatura, que demonstraram as significativas interferências que as composições dos meios de cultura bacteriológicos causam na especiação química, biodisponibilidade e toxicidade de metais, como o mercúrio (Ramamoorthy & Kushner, 1975; Hughes & Poole, 1991; Farrell *et al.*, 1993; Pike *et al.*, 2002).

5.1.4 - Isolamento de Bactérias Resistentes ao Mercúrio

A exposição de microorganismos a metais tóxicos presentes no meio ambiente contribuiu para que ao longo da evolução fossem desenvolvidos mecanismos de resistência a esses elementos. A poluição de sistemas aquáticos e de solos por metais pesados provocada pelo homem contribuiu para a ocorrência de microorganismos resistentes se tornasse ainda maior (Mindlin *et al.*, 2005; Jaysankar *et al.*, 2006). Na maioria dos casos, a presença de cepas bacterianas resistentes ao mercúrio está correlacionada aos níveis de mercúrio no ambiente, porém bactérias resistentes têm sido isoladas inclusive em ambientes sem histórico de contaminação por mercúrio, demonstrando a eficiência e ubiquidade do mecanismo de resistência mediado pelo operon-*mer* (Hart *et al.*, 1998; Mindlin *et al.*, 2005).

Muitas vezes os termos “resistência” e “tolerância” são usados indistintamente em trabalhos científicos, sem definições específicas. Entretanto, Gadd (1992) propõe que o termo “resistência” seja usado apenas quando a sobrevivência de micro-organismos expostos a substâncias químicas tóxicas seja resultante de mecanismos específicos de detoxificação, geralmente geneticamente codificados. Um bom exemplo é o processo de detoxificação bacteriana do mercúrio através da redução do Hg(II) a mercúrio elementar (Hg⁰). Por outro lado, o termo “tolerância” a um elemento tóxico seria resultante de características bioquímicas ou estruturais próprias dos organismos (ex: presença de parede celular impermeável ou produção de substâncias capazes de prover a imobilização de um metal tóxico dentro da célula bacteriana) ou mesmo mecanismos não específicos de defesa (não produzidos em resposta direta a este elemento tóxico específico). Como não podemos afirmar que todas as cepas bacterianas isoladas possuem o mecanismo de resistência para o mercúrio mediado pelos genes que compõem o operon-*mer*, preferimos utilizar a denominação “tolerante / resistente” como referência às cepas capazes de crescer em Ágar Nutriente contendo 5 µM Hg.

Neste trabalho, foi observado que todas as amostras de água coletadas, nos diferentes ecossistemas aquáticos brasileiros, apresentaram cepas bacterianas capazes de crescer em placas de Ágar Nutriente com 5 µM Hg (concentração mínima seletiva). Foram obtidas no total, 88 cepas resistentes em Rondônia, 49 cepas no Rio de Janeiro e 14 cepas em Mato Grosso (Tabela 1).

No Rio de Janeiro, as amostras de água foram coletadas em diferentes pontos ao longo da Bacia da Baía de Guanabara, este ecossistema aquático tem histórico de contaminação por mercúrio devido à presença de uma indústria de cloro-soda que no passado lançou grandes quantidades de mercúrio em suas águas. Embora a distribuição do mercúrio na Bacia da Baía de Guanabara não seja homogênea no sedimento, conforme relatam alguns trabalhos (Machado *et al.*, 2002; Kehrig *et al.*, 2003), foram isoladas cepas bacterianas tolerantes / resistentes em todos os pontos ao longo da Baía. Em Rondônia, as amostras de água foram coletadas em diversos pontos ao longo do Rio Jamari, que faz parte da Bacia do Rio Madeira. Grande parte da degradação ambiental encontrada neste local de coleta deve-se a construção da Usina Hidrelétrica de Samuel, que provocou o intenso desmatamento nessa região. Embora, não existam registros da contaminação por mercúrio nesse sistema aquático, em todos pontos foram isoladas cepas resistentes / tolerantes. Em Mato Grosso, as amostras de água foram coletadas em pisciculturas do município de Alta Floresta, que desde o início da década de 1980 até meados da década de 1990 eram áreas de garimpo de ouro onde grandes quantidades de mercúrio foram liberadas (Hacon *et al.*, 2008; Wasserman *et al.*, 2008). Apesar dos riscos à saúde que o consumo de peixes provenientes dessas pisciculturas pode causar foram os governantes da região que estimularam a população local a investir na criação de peixes em antigas áreas de garimpo (Hacon *et al.*, 2005). Nessa área de estudo também foram isoladas cepas resistentes / tolerantes em todos os pontos de coleta.

Tabela 1 – Número de amostras de água coletadas e de cepas bacterianas isoladas de diferentes sistemas aquáticos brasileiros

| Estado de coleta | Amostras de água coletadas | Total de cepas isoladas |
|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| RJ | 11 | 49 |
| RO | 07 | 88 |
| MT | 04 | 14 |
| Total | 03 | 151 |

5.2 – Determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Inibitória (MIC)

Durante o desenvolvimento dos ensaios para a determinação do MIC das cepas estudadas, observou-se que era necessário adaptar os protocolos tradicionalmente utilizados na microbiologia clínica para este tipo de estudo, geralmente associado à resistência a antibióticos. Primeiramente, porque não existem níveis de mercúrio estabelecidos na literatura que definam claramente o que são bactérias sensíveis ou resistentes, como temos no caso dos antibióticos

(Malik & Jaiswal, 2000). Por isso, muitas vezes, é difícil comparar os resultados obtidos com trabalhos pretéritos da literatura. Segundo, diferentemente das soluções e meios contendo antibióticos, as soluções e meios de cultura contendo não só o mercúrio, mas também outros metais pesados, não permanecem estáveis com o tempo. Os metais, em especial o mercúrio, tendem a serem removidos do meio por diversos mecanismos, tais como: adsorção às paredes dos frascos utilizados, precipitação ou volatilização da solução (Ramamoorthy & Kushner, 1975). Para estabilizar soluções aquosas contendo metais é necessário manter o pH da solução em níveis muito baixos (ex: $\text{pH} < 2$), que normalmente impediriam o crescimento biológico, ou adicionar quelantes como o EDTA, que por sua vez podem gerar outros efeitos indesejáveis na determinação do MIC. Neste último caso, a composição do meio (ex: presença de quelantes) pode interferir significativamente na biodisponibilidade do mercúrio e conseqüentemente no MIC obtido nos experimentos. Este aspecto é, na maioria dos casos, irrelevante ou não considerado nos experimentos com antibióticos (Hughes & Poole, 1991).

Durante este estudo, foi observada uma relação inversa entre a concentração de mercúrio adicionada ao meio de cultura e o número de cepas bacterianas capazes de crescer. Nas amostras do Rio de Janeiro ($n = 49$), apenas 4 % dos isolados bacterianos apresentaram valores de MIC inferiores a $20 \mu\text{M}$, enquanto que 96 % das cepas bacterianas isoladas apresentaram valores de $\text{MIC} \geq 20 \mu\text{M}$. Nas amostras de Rondônia ($n = 88$), 33 % dos isolados bacterianos tiveram valores de MIC inferiores a $20 \mu\text{M}$ e 67 % tiveram valores de MIC iguais a $20 \mu\text{M}$. Nas amostras de Mato Grosso ($n = 14$), 36% cepas bacterianas isoladas

apresentaram valores de MIC inferiores a 20 μM . Enquanto que 64% das amostras apresentaram valores de MIC \geq 20 μM . Dentre esses isolados bacterianos com maiores valores de MIC, quatro cepas bacterianas foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 40 μM de Hg. Essas cepas apresentaram valores de MIC iguais a 45 μM , o valor mais alto obtido neste estudo (Figuras 8, 9 e 10).

Este ensaio foi de grande importância para caracterização das cepas bacterianas isoladas neste trabalho já que revela os diferentes níveis de resistência ao mercúrio apresentados. Em resumo, podemos dizer que das 151 cepas isoladas, nove apresentam os maiores níveis de resistência, ou seja, os maiores valores de MIC, são elas: M20, M23 e M26 com MIC = 30 μM (Rio de Janeiro); M140, M141, M142 e M144 com MIC = 40 μM (Mato Grosso) e M145 e M148 com MIC = 40 μM (Mato Grosso).

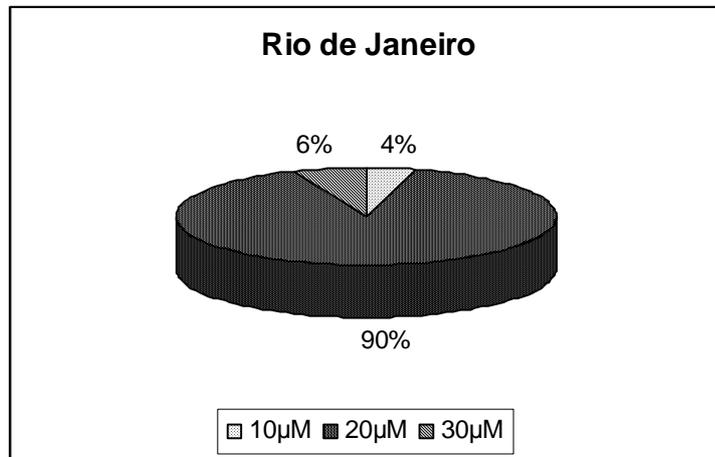


Figura 8 - Distribuição percentual de isolados bacterianos de amostras do estado do Rio de Janeiro de acordo com os valores de MIC.

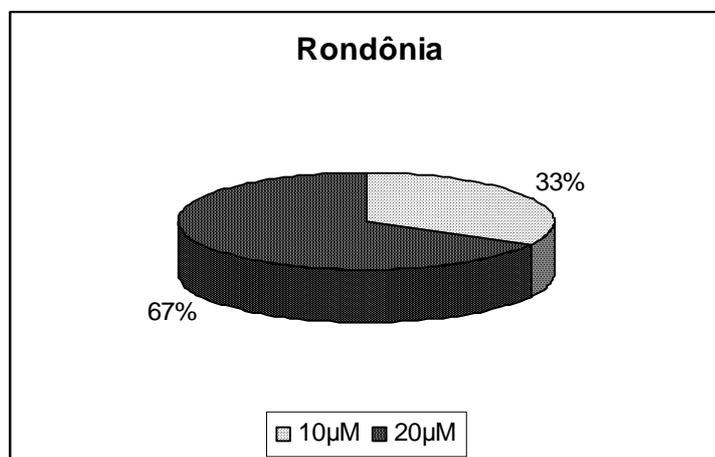


Figura 9 - Distribuição percentual de isolados bacterianos de amostras do estado do Rondônia de acordo com os valores de MIC.

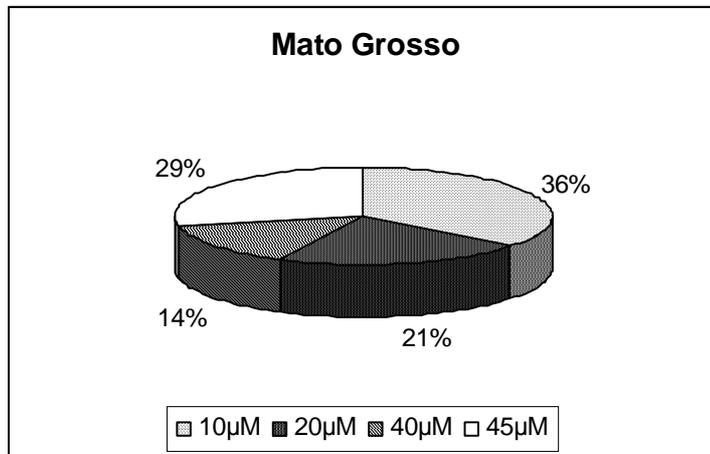


Figura 10 - Distribuição percentual de isolados bacterianos de amostras do estado do Mato Grosso de acordo com os valores de MIC.

Esta diferença no nível de resistência bacteriana ao mercúrio entre os sistemas estudados pode ser justificada pelo histórico de utilização deste elemento nestes ambientes. Tanto a Bacia da Baía de Guanabara (RJ) quanto as pisciculturas de Alta Floresta (MT) têm histórico de contaminação por mercúrio, a primeira de origem industrial e a segunda devido à atividade garimpeira comum na década de 1980 na região norte do estado do Mato Grosso. Nesses ecossistemas aquáticos, onde os níveis de mercúrio são provavelmente mais elevados, foram isoladas as cepas bacterianas com os maiores valores de MIC. As cepas bacterianas provenientes das amostras de água coletadas em Rondônia apresentaram os valores de MIC mais baixos que não ultrapassaram 20 µM Hg.

Fazendo uma revisão da literatura é possível notar que, assim como as concentrações de mercúrio usadas para isolamento de cepas bacterianas resistentes presentes em amostras variam consideravelmente quando comparamos diferentes estudos, as concentrações de mercúrio mínimas inibitórias (MICs) também apresentam grandes variações. Alguns trabalhos relatam valores de MIC semelhantes aos encontrados no presente estudo. Como exemplo, podemos citar o trabalho desenvolvido por Wagner-Döbler *et al.* (2000) envolvendo bactérias geneticamente modificadas pertencentes à família Bacillaceae. Essas amostras bacterianas apresentaram valores de MIC que variaram entre 5 e 50 μM Hg. Porém, outros estudos revelam valores de MIC muito superiores aos encontrados por nós nesse trabalho. Por exemplo, Zeroual *et al.*, (2001) isolaram uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* com MIC igual a 2400 μM Hg. Malik & Jaiswal (2000) analisando cepas de *Pseudomonas* sp. isoladas a partir de amostras de solo contaminado por resíduos industriais obtiveram cepas resistentes com valores MIC iguais a 1000 μM Hg em meio de cultura Ágar Nutriente. Rasmussen & Sorensen (1998) investigando os efeitos do mercúrio na composição de comunidades bacterianas presentes em sedimentos detectaram cepas com valores de iguais a 200 μM Hg em meio de cultura LB Ágar. Horn *et al.* (1994) analisando 11 cepas de *Pseudomonas* resistentes ao mercúrio detectaram uma cepa capaz de crescer em 400 μM de Hg. Resumindo, nos trabalhos analisados foram observados valores de MIC que variaram de 5 até 2400 μM Hg, ou seja, concentrações mercuriais que variam cerca de 500 vezes. Uma das possíveis explicações para as discrepâncias entre os valores de MIC observados

neste estudo e nos demais trabalhos anteriormente citados pode ser o modo de preparo da solução de mercúrio usada. Embora o modo de preparo de soluções metálicas seja uma etapa importante da metodologia, poucos estudos a descrevem. Na maioria dos trabalhos, o mercúrio utilizado é proveniente de um sal metálico a partir do qual se prepara uma solução-mãe concentrada. A partir dessa solução-mãe são feitas diluições até atingir as concentrações menores desejadas. Esse procedimento aumenta as chances de que parte do mercúrio adicionado inicialmente seja perdido ao longo do processo, caso essas soluções não sejam acidificadas. Por exemplo, Nakahara *et al.* (1977) relataram que no preparo da solução de HgCl_2 , que seria posteriormente adicionada ao meio de cultura para testes de susceptibilidade bacteriana ao mercúrio, utilizaram água destilada não acidificada. Uma das conseqüências desse fato é a perda de grande parte do mercúrio para as paredes do frasco onde foi preparada a solução metálica, principalmente se a solução não for utilizada imediatamente após o preparo. Outro problema é a autoclavação de soluções, muito comum na bacteriologia para evitar a contaminação biológica. Isso porque ao aquecermos uma solução metálica, durante o processo de esterilização, não só perde-se parte do solvente usado, nesse caso a água, como também a alta temperatura que pode provocar a perda de mercúrio por volatilização. Por exemplo, no estudo de Hassen *et al.* (1998) embora tenham acidificado as soluções metálicas preparadas para os testes de resistência, não garantiram a estabilidade da solução já que as mesmas foram autoclavadas por 15 minutos a 110°C e não foram feitas análises químicas para verificação da concentração final de mercúrio.

5.3 - Avaliação da Resistência Bacteriana aos Antibióticos

Em 1960, foi feito o primeiro relato sobre bactérias resistentes ao mercúrio e a antibióticos simultaneamente (Moore, 1960). Depois disso, outros estudos revelaram que a resistência a metais é fortemente ligada à resistência a antibióticos, isso porque os genes que conferem ambas resistências são comumente localizados nos mesmos plasmídios (Hobman & Brown, 1997; Barkay *et al.*, 2003). Estes elementos genéticos são facilmente transferidos horizontalmente entre bactérias, fazendo com que mecanismos de resistência tenham ampla distribuição (Osborn *et al.*, 1997). Assim, o aumento significativo do uso e das descargas de mercúrio e de outros metais no ambiente pode estar favorecendo a seleção de cepas bacterianas resistentes a antibióticos. Outro fato que também contribuiu para a forte associação entre resistência bacteriana a antibióticos e aos metais é o fato de que, no passado, compostos mercuriais foram amplamente usados para o tratamento de doenças de origem bacteriana e como desinfetante, em hospitais (Hobman & Brown, 1997). O uso concomitante de soluções à base de mercúrio e de antibióticos no ambiente hospitalar favoreceu fortemente para a seleção de micro-organismos que apresentassem resistência ao mercúrio e a antibióticos concomitantemente. A seleção dos oito antibióticos para este ensaio baseou-se em artigos da literatura em que a relação entre mercúrio e antibióticos foi observada (Harnett & Gyles, 1984; Österblad *et al.*, 1995; Nascimento *et al.*, 1999; Mazele *et al.*, 2000; Lima-Bittencourt *et al.*, 2007).

Os critérios para seleção das cepas para avaliação da resistência a antibióticos foram os valores MIC previamente determinados e a representatividade geográfica. Sendo assim, foram selecionadas 25 cepas provenientes do Rio de Janeiro, 39 cepas de Rondônia e 5 cepas de Mato Grosso. Todas as 69 cepas bacterianas selecionadas para este ensaio apresentaram valores de MIC $\geq 20 \mu\text{M}$ (Tabela 2). Dos oito antibióticos selecionados, a Ampicilina foi a droga de menor eficiência. Isso porque, 42 amostras bacterianas, ou seja, 61% das cepas testadas apresentaram resistência a esse antibiótico. Em segundo lugar, vem a Tetraciclina com 17% de amostras bacterianas resistentes. Na seqüência, temos o Ácido Nalidíxico com 11% de amostras bacterianas resistentes. Houve empate entre as drogas Canamicina e Cloranfenicol com 9 % de cepas resistentes. Os antibióticos mais efetivos foram Estreptomicina, Gentamicina e Sulfametoxazol-trimetoprim.

O quadro 4 destaca os perfis de resistência a antibióticos apresentados pelas nove cepas bacterianas com os valores de MIC mais elevados. Ao contrário das amostras de Mato Grosso, que se mostraram resistentes a todos os antibióticos testados, as amostras do Rio de Janeiro apresentaram-se sensíveis à maioria dos fármacos. Apenas a amostra bacteriana M26 foi resistente ao Ácido Nalidíxico e a Ampicilina, enquanto que as amostras M20 e M23 foram sensíveis a todos os antibióticos testados.

Tabela 2 – Percentual de amostras bacterianas dos diferentes sistemas aquáticos brasileiros resistentes a antibióticos

| Antibióticos | Locais de coleta | | | |
|--------------------------------|------------------|----------------|----------------|-------------------|
| | RJ (n = 25) | RO (n = 39) | MT (n = 05) | Total (n = 69) |
| Ampicilina | 44 % | 67 % | 100 % | 61 % |
| Tetraciclina | 28 % | 0 % | 100% | 17 % |
| Ácido nalidíxico | 8 % | 0 % | 100 % | 11 % |
| Canamicina | 4 % | 0 % | 100 % | 9 % |
| Cloranfenicol | 4 % | 0 % | 100 % | 9 % |
| Estreptomicina | 0 % | 0 % | 100 % | 7 % |
| Gentamicina | 0 % | 0 % | 100 % | 7 % |
| Sulfametoxazol- trimetoprim | 0 % | 0 % | 100 % | 7 % |

Quadro 4 – Perfis de resistência aos antibióticos testados nas cepas bacterianas isoladas com valores de MIC mais elevados

| Amostras | Antibióticos Testados | | | | | | | |
|--------------------|------------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|------------|----------|------------|
| Bacterianas | C | TE | S | NA | CN | SXT | K | AMP |
| M20 | S | S | S | S | S | S | S | S |
| M23 | S | S | S | S | S | S | S | S |
| M26 | S | S | S | R | S | I | S | R |
| M140 | R | R | R | R | R | R | R | R |
| M141 | R | R | R | R | R | R | R | R |
| M142 | R | R | R | R | R | R | R | R |
| M144 | R | R | R | R | R | R | R | R |
| M145 | R | R | R | R | R | R | R | R |
| M148 | R | R | R | R | R | R | R | R |

Legenda: C= Cloranfenicol; TE= Tetraciclina; S= Estreptomicina; NA= Ácido Nalidíxico; CN= Gentamicina; SXT= Sulfametoxazol-Trimetoprim; K= Canamicina; AMP= Ampicilina; R= Resistente; S= Sensível; I= Intermediário

Perfis de resistência a antibióticos semelhantes aos encontrados neste trabalho foram encontrados em outros estudos. Harnett & Gyles (1984) isolaram amostras de *E. coli* resistentes ao mercúrio e ao mesmo tempo aos antibióticos Ampicilina, Cloranfenicol, Canamicina, Estreptomicina e Tetraciclina. Österblad *et al.*, (1995) estudando bacilos Gram-negativos, resistentes ao mercúrio, isolados a

partir da flora fecal de humanos verificaram que 36% das amostras testadas eram resistentes ao mercúrio e a dois antibióticos ou mais concomitantemente. Nesse trabalho, o padrão de resistência mais comum foi a resistência ao mercúrio e a Ampicilina. Esse mesmo perfil de resistência (Hg + Ampicilina) foi observado por Murtaza *et al.*, (2002) em amostras de *E.coli* resistentes ao mercúrio. Ferreira *et al.* (2007) observaram uma correlação positiva entre a resistência ao mercúrio e aos antibióticos Sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina em amostras de enterobactérias isoladas a partir de efluentes industriais. Lima-Bittencourt *et al.* (2007) observaram correlações importantes envolvendo resistência ao mercúrio e aos antibióticos Ampicilina, Ácido Nalidíxico e Cloranfenicol em enterobactérias. De um modo geral, podemos concluir comparando o presente trabalho e os estudos citados que a resistência à Ampicilina é fortemente associada à resistência ao mercúrio.

5.4 – Identificação das Cepas Bacterianas Isoladas

O mecanismo de resistência bacteriana ao mercúrio mediado pelos genes que compõem o operon-*mer* é amplamente distribuído em populações bacterianas, podendo ser encontrado tanto em bactérias Gram-positivas e quanto em Gram-negativas. Na verdade, esse mecanismo específico de resistência já foi identificado numa grande variedade de procariontes (Hobman & Brown, 1997). O

primeiro passo para identificação das cepas bacterianas resistentes isoladas foi o método de coloração de Gram. A aplicação desta técnica revelou que no estado do Rio de Janeiro, 73% das amostras bacterianas isoladas são Gram-negativas, enquanto que 27% são Gram-positivas. Esta proporção também foi observada em Rondônia, onde 78% dos isolados são Gram-negativos e 22% são Gram-positivos. Porém, no estado do Mato Grosso, houve uma inversão desses valores. Isso porque, ao contrário dos outros locais de estudo onde o percentual de cepas Gram-negativas sempre foi superior ao de cepas Gram-positivas, nesse estado brasileiro cerca de 80% das amostras bacterianas foram classificadas como Gram-positivas (Figuras 11, 12 e 13).

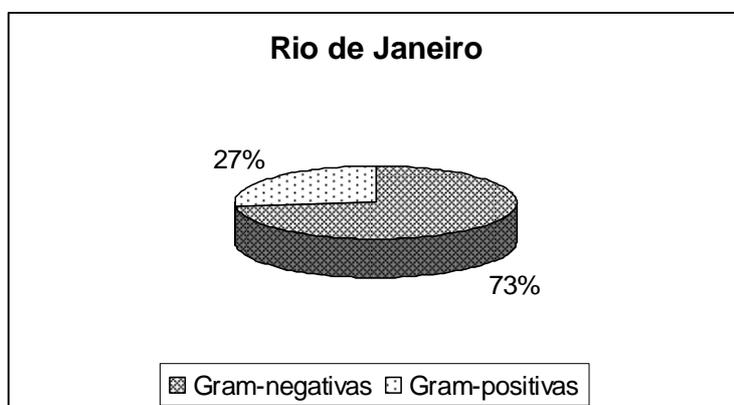


Figura 11 - Distribuição percentual dos isolados bacterianos de amostras do estado do Rio de Janeiro de acordo com o Teste de Gram.

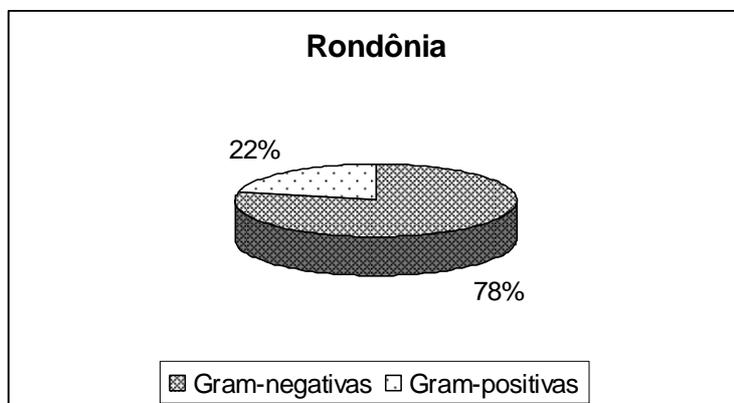


Figura 12 - Distribuição percentual dos isolados bacterianos de amostras do estado de Rondônia de acordo com o Teste de Gram.

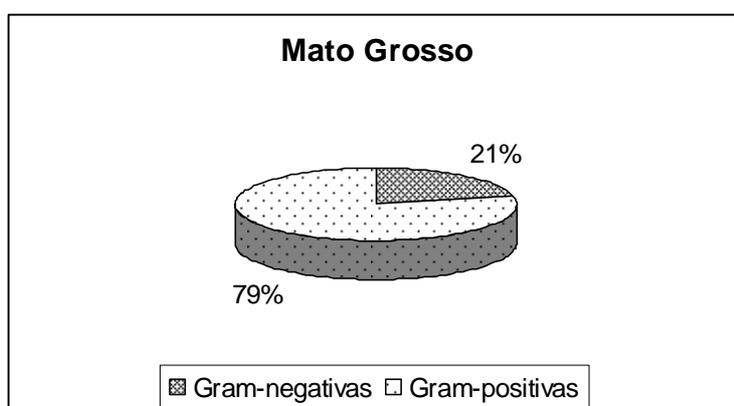


Figura 13 - Distribuição percentual dos isolados bacterianos de amostras do estado do Mato Grosso de acordo com o Teste de Gram.

Apenas as amostras com valores de MIC superiores a 20 μ M foram selecionadas para a identificação ao nível de espécie por meio de kits de identificação comerciais. No estado do Rio de Janeiro três amostras atenderam ao critério estabelecido (M20, M23 e M26) e no Mato Grosso cinco amostras (M140, M141, M142, M144, M145 e M148). Nenhuma amostra bacteriana proveniente de Rondônia apresentou MIC > 20 μ M. As amostras do Rio de Janeiro, por serem Gram-negativas, passaram pelos kits BD BBL Crystal™ para Bactérias Entéricas e Não-fermentadoras seguindo as normas recomendadas pelo fabricante e foram identificadas como: *Klebsiella oxytoca* (M20), *Leclercia adenocaryolata* (M23) e *Aeromonas caviae* (M26). Já as amostras do Mato Grosso, por serem Gram-positivas, passaram pelos kits BD BBL Crystal™ para Bactérias Gram-positivas e foram identificadas como: *Bacillus subtilis* (M140), *Staphylococcus hominis* (M141), *Staphylococcus epidermis* (M142), *Bacillus subtilis* (M144 e M145), *Paenibacillus alvei* (M148). Esses resultados e parte dos apresentados anteriormente podem ser visualizados de forma simplificada no quadro 5.

O gênero *Klebsiella* apresenta ubiqüidade na natureza, podendo ser encontrado em uma diversidade de *habitats* como a superfície de vegetais, o solo e a água. Infecções por *Klebsiella* estão, na maioria dos casos, associadas às hospitalizações e os indivíduos imunodeprimidos são os alvos principais. Geralmente, a espécie responsável por essas infecções é *Klebsiella pneumoniae*. Por outro lado, a espécie *Klebsiella oxytoca* raramente é isolada em amostras clínicas humanas (Podschun & Ullman, 1998). Nos últimos anos, alguns estudos têm apontado *Klebsiella oxytoca* como causadora de um tipo de inflamação do

cólon que pode provocar graves hemorragias (Högenauer *et al.*, 2006). Além disso, no setor industrial essa espécie tem sido considerada uma alternativa promissora para a produção do biocombustível etanol (Dien *et al.*, 2003).

Leclercia adenocarboxylata é uma espécie bacteriana pertencente à Família Enterobacteriaceae, que embora apresente todas as características típicas a este grupo (ex.: Gram-negativa, anaeróbia-facultativa, oxidase-negativa, mesofílica) não possui o potencial de patogenicidade encontrado na maioria dos membros desta família. Esta espécie é amplamente distribuída na natureza, podendo ser isolada de amostras ambientais e clínicas. Existem poucos trabalhos que relatam sobre infecções causadas por *Leclercia adenocarboxylata* por isso esta espécie costuma ser descrita como um patógeno oportunista raro (Stock *et al.*, 2004).

O gênero *Aeromonas* é comumente encontrado em amostras de solo e de água doce. Inicialmente, esse gênero fazia parte da família Vibrionaceae, mais tarde, investigações filogenéticas revelaram que o gênero *Aeromonas* não está relacionado aos víbrios (Abbott *et al.*, 2003). Nas últimas décadas esses microorganismos adquiriram certa notoriedade por serem responsáveis por casos de gastroenterite e de infecções de pele. Os membros deste gênero são frequentemente isolados em amostras de fezes e cerca de 70% dos isolados costumam ser da espécie *Aeromonas caviae*. Diferentemente, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas hydrophila* são considerados patógenos entéricos de menor importância, devido à ausência de fatores de virulência (Goni-Urriza *et al.*, 2000).

O gênero *Staphylococcus* apresenta ampla distribuição na natureza. Geralmente, esses organismos estão associados à pele, à superfície de glândulas

e às mucosas de animais de sangue quente. São isolados frequentemente em amostras de alimento como carne, queijos e leite e em amostras ambientais como solo, areia, água do mar, água doce e ar. Embora esse gênero bacteriano seja comumente associado a infecções humanas, durante muito tempo apenas a espécie, coagulase-positiva, *Staphylococcus aureus* foi considerada patogênica. Nas últimas décadas, as espécies coagulase-negativas também adquiriram importância clínica principalmente em pacientes imunocomprometidos. Dentre essas espécies, *Staphylococcus epidermidis* é a espécie mais associada a doenças, geralmente, infecções urinárias e após cateterismo. Já *Staphylococcus hominis* está associado a infecções do endocárdio (Wieser & Busse, 2000).

Bacillus subtilis é uma espécie capaz de habitar uma grande diversidade de compartimentos ambientais, por isso é considerada ubíqua na natureza. Essa espécie, assim como os outros membros do gênero *Bacillus*, é capaz de formar endosporos altamente resistentes. Por isso, podem suportar situações extremas de privação nutricional e de estresse ambiental. Ao contrário das espécies bacterianas listadas anteriormente, *Bacillus subtilis* não é causadora de infecções. Por isso tem sido usada, ultimamente, como próbiotico para recomposição da flora bacteriana intestinal humana (Earl *et al.*, 2008).

Os membros do gênero *Paenibacillus* são anaeróbios facultativos ou aeróbios estritos e formam esporos assim como os membros do gênero *Bacillus*. Esses organismos são encontrados em diversos ambientes, como solo, água, vegetais, alimentos, raízes, insetos e em hospitais. A espécie *Paenibacillus alvei*

possui flagelo que contribui para a mobilidade e para formação de biofilmes (Fujihara *et al.*, 2009).

Quadro 5 – Caracterização das cepas bacterianas isoladas com os valores de MIC mais elevados (MIC > 20 µM)

| Amostra | Origem | MIC | Teste de Gram | Identificação | Multi-resistente |
|---------|--------|-------|---------------|------------------------------------|------------------|
| M20 | RJ | 30 µM | Gram negativa | <i>Klebsiella oxytoca</i> | Não |
| M23 | RJ | 30 µM | Gram negativa | <i>Leclercia adenocarboxylata.</i> | Não |
| M26 | RJ | 30 µM | Gram negativa | <i>Aeromonas caviae</i> | Não |
| M140 | MT | 45 µM | Gram Positiva | <i>Bacillus subtilis</i> | Sim |
| M141 | MT | 45 µM | Gram positiva | <i>Staphylococcus hominis</i> | Sim |
| M142 | MT | 45 µM | Gram positiva | <i>Staphylococcus epidermis</i> | Sim |
| M144 | MT | 45 µM | Gram positiva | <i>Bacillus subtilis</i> | Sim |
| M145 | MT | 40 µM | Gram positiva | <i>Bacillus subtilis</i> | Sim |
| M148 | MT | 40 µM | Gram positiva | <i>Paenibacillus alvei</i> | Sim |

5.5 - Amplificação do gene *merA*

A maior parte dos estudos envolvendo os genes que compõem o operon-*mer* de resistência ao mercúrio envolve bactérias Gram-negativas (Hobman e Brown, 1997; Osborn *et al.*, 1997; Hart *et al.*, 1998). Nesse grupo, é comum que o operon-*mer* esteja localizado nos transposons Tn501 e Tn21 e no plasmídeo pDU1358, indicando o potencial de mobilidade desses elementos entre as bactérias. Em comparação, o operon-*mer* das bactérias Gram-positivas é menos estudado. Um dos motivos para esse fato é a grande variabilidade das seqüências do gene *merA* nesse grupo bacteriano (Felske *et al.*, 2003; Stapleton *et al.*, 2004). Em Gram-positivas, alterações no terminal 5' do gene que codifica o domínio N-terminal provocam alterações sensíveis no tamanho das seqüências nucleotídicas do gene *merA* (Stapleton *et al.*, 2004). Uma das explicações para as diferenças que existem entre o operon-*mer* de Gram-negativas e de Gram-positivas é a suposição de que a resistência ao mercúrio tenha se desenvolvido num momento anterior à divergência evolutiva que resultou nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Helmann *et al.*, 1989). Uma hipótese alternativa, sugerida por Mindlin *et al.* (2001), foi a ocorrência de recombinações sucessivas entre os operon-*mer* inseridos em transposons presentes em bactérias Gram-negativas com os transposons que integravam o genoma de bactérias Gram-positivas. Diante da variabilidade da seqüência do gene *merA* em bactérias Gram-positivas, apenas as amostras bacterianas Gram-negativas isoladas neste trabalho com elevados

valores de MIC (MIC > 20 µM) foram submetidas à técnica de PCR para investigação genética.

Após a reação de PCR utilizando os iniciadores específicos (A1 e A5) para detecção de uma região altamente conservada do gene *merA* (Liebert *et al.*, 1997), observou-se que as cepas *Leclercia adenocarboxylata* e *Aeromonas caviae* (M23 e M26, respectivamente) apresentaram fragmentos amplificados no tamanho esperado (1238 pb), enquanto que a cepa *Klebsiella oxytoca* (M20) não apresentou amplificação (Figura 14). A cepa padrão *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, resistente ao mercúrio, usada como controle positivo da reação, apresentou amplificação com o peso molecular esperado, enquanto que a cepa sensível *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23724, usada como controle negativo da reação, não apresentou fragmentos amplificados.

A amplificação de fragmentos correspondes ao gene *merA* nas cepas *Leclercia adenocarboxylata* e *Aeromonas caviae* permite que as mesmas sejam classificadas como resistentes ao mercúrio. Por outro lado, embora a cepa *Klebsiella oxytoca* não tenha apresentado ampliações genéticas é possível especular que mecanismos intrínsecos tenham permitido a sobrevivência da mesma em elevadas concentrações mercúrio. Como exemplo, podemos citar a produção de polissacarídeos extracelulares, comum ao gênero *Klebsiella*, descrita Bitton & Freihofer (1978). Em grandes quantidades, é possível que esses polissacarídeos atuem como complexantes de íons mercúrio fora do ambiente celular reduzindo o efeito tóxico do metal sobre a célula. Além desta explicação, é possível que a cepa *Klebsiella oxytoca* isolada neste trabalho apresente uma

seqüência do gene *merA* muito diferente das seqüências genéticas anteriormente descritas e por isso, a metodologia aplicada pode não ter sido capaz de detectá-lo.

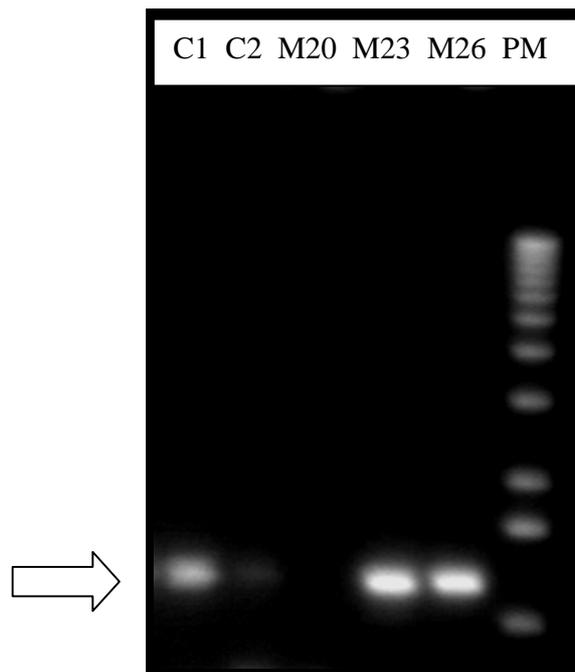


Figura 14 - Foto do gel de eletroforese. C1 = Controle positivo / *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; C2 = Controle negativo / *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23724; M20 = *Klebsiella oxytoca*; M23 = *Leclercia adenocaryolata*; M26 = *Aeromonas caviae*; PM = Padrão de peso molecular.

5.6 - Detecção do Hg⁰ utilizando filme de raios-X

Existem poucas técnicas capazes de quantificar a redução bacteriana do Hg(II) em mercúrio metálico, dentre as técnicas descritas podemos citar o uso de mercúrio radioativo (²⁰³Hg) como substrato para a reação de redução, analisado por cintilografia. Na maioria dos casos, essas técnicas são de alto custo e exigem muito tempo para elaboração (Cursino *et al.*, 2003). O método para detecção da volatilização do mercúrio por meio da sensibilização de filme de raios-X embora não seja quantitativo, permite que seja feito de maneira rápida e com baixo custo uma varredura dentre as cepas isoladas visando identificar quais são capazes de reduzir o Hg(II). O vapor de mercúrio elementar (Hg⁰) produzido pelas cepas resistentes forma uma amálgama com a prata que reveste o filme de raios-X, fazendo com que surjam manchas no filme, que podem ser visualizadas após a sua revelação.

A seleção das amostras para este teste foi a mesma usada para seleção de amostras para a técnica de PCR. Após a revelação do filme de raios-X, foram observadas manchas escuras nos locais da placa onde as cepas *Leclercia adenocarboxylata* (M23) e *Aeromonas caviae* (M26) foram semeadas (Figura 15). Este resultado sugere que essas cepas são capazes de volatilizar o mercúrio através da expressão do gene *merA*, formando o vapor de mercúrio metálico. É importante ressaltar que esses resultados corroboram os relatados anteriormente. Isso porque, as cepas bacterianas que tiveram fragmentos amplificados pela

técnica de PCR são as mesmas capazes de volatilizar o mercúrio segundo a técnica de sensibilização do filme de raios-X. A cepa *Klebsiella oxytoca* (M20) além de não ter apresentado amplificação, não foi capaz de volatilizar o mercúrio. Nestes experimentos foram utilizados controles, de forma a assegurar que os resultados obtidos não fossem decorrentes da volatilização abiótica do mercúrio (C1= meio reacional acrescido de Hg sem cepa bacteriana) ou da volatilização de outra substância proveniente de reações biológicas (C2= meio reacional sem adição de mercúrio com a cepa bacteriana). Assim, este experimento permite fazer uma triagem, distinguindo as cepas bacterianas resistentes ao mercúrio das sensíveis. Seus resultados, ainda que qualitativamente, permitem avaliar a capacidade de cepas bacterianas formarem mercúrio elementar. Resultados semelhantes foram observados por outros pesquisadores (Lilley *et al.*, 1996; Brim *et al.*, 2000; Murtaza *et al.*, 2002; Vetriani *et al.*, 2005).



Figura 15 - Foto do filme de raios-X após revelação. Notar o aparecimento de manchas escuras referentes às amostras M23 (*Leclercia* sp.) e M26 (*Aeromonas* sp.). C1 = Meio reacional + Hg – Bactéria; C2 = Meio reacional – Hg + Bactéria.

5.7 - Quantificação da Redução do Hg(II) em Hg⁰

A maioria dos tratamentos para a remoção de mercúrio presente em solos, em sedimentos e em sistemas aquáticos consiste no uso de métodos baseados na afinidade que esse metal tem por alguns materiais específicos. Por exemplo, para tratamento de água contaminada por mercúrio é comum o uso de resinas de troca iônica (Chen & Wilson, 1997). Em substituição a esses métodos de descontaminação, que em geral demandam grande investimento financeiro, tem sido avaliado o uso de micro-organismos para remediação de ambientes contaminados por metais (Kiyono *et al.*, 2003; Gupta & Ali, 2004). Algumas atividades de potencial biorremediador desempenhadas por micro-organismos são a biotransformação (reações de oxidação e de redução de metais), a bioprecipitação (precipitação de íons metálicos na superfície da célula) e a bioadsorção (adsorção de metais pela biomassa microbiana). Embora seja de grande importância a descontaminação de ambientes poluídos por metais pesados, técnicas de biorremediação ainda são alternativas pouco aplicadas (Wagner-Dobler *et al.*, 2000). A compreensão dos mecanismos de detoxificação microbiana pode possibilitar o desenvolvimento de metodologias de biotransformação ecologicamente compatíveis com o ambiente atingido (Cursino *et al.*, 2000). Neste trabalho, avaliou-se o uso de uma bactéria resistente para remoção de mercúrio de uma solução por meio da reação de redução do mercúrio iônico em mercúrio elementar. O método escolhido para análise do mercúrio

presente nas amostras (meio de cultura e solução de permanganato) foi a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio. Esse método é um dos mais usados para determinação de mercúrio em amostras ambientais e biológicas. Suas vantagens principais são a seletividade, a sensibilidade e a praticidade em relação aos outros métodos (Doering *et al.*, 2000; Mirabó *et al.*, 1997; Rooney *et al.*, 1976). As amostras de meio de cultura e de permanganato foram digeridas conforme o método 245.1 da EPA (1994) para evitar possíveis interferências da matriz na análise do mercúrio total. Embora Cursino *et al.* (2003) tenham relatado a dificuldade em analisar mercúrio em meio de cultura, alegando ser uma matriz orgânica de grande complexidade e de difícil digestão, não tivemos dificuldades na digestão e na análise das amostras com a metodologia adotada.

A amostra bacteriana escolhida para este ensaio foi *Leclercia adenocarboxylata* (M23) e o critério para escolha baseou-se no elevado nível de resistência ao mercúrio apresentado por essa cepa (MIC = 30 μ M Hg) e nos resultados positivos da técnica de PCR e do ensaio de sensibilização de filme de raios-X, descritos anteriormente. Além disso, essa cepa mostrou-se sensível a todos os antibióticos testados e pertence à um gênero bacteriano de baixo potencial patogênico quando o comparamos a outros gêneros das Família Enterobacteriaceae. Essas características fazem dessa amostra bacteriana uma ótima candidata para biorremediação da contaminação por mercúrio. Não só pela capacidade de detoxificação do mercúrio apresentada pela cepa, mas também por sua sensibilidade aos fármacos testados. Isso porque em casos de acidentes

durante a manipulação desta amostra bacteriana que causem infecção humana é possível o tratamento por meio de antibióticos.

Para avaliar a influência do tempo no processo de redução bacteriana do mercúrio, foram utilizados cinco sistemas de redução descritos na seção 4.9.2. O sistema controle da reação de redução era idêntico aos demais, porém não continha a bactéria resistente ao mercúrio. Os outros quatro sistemas, que continham a bactéria resistente ao mercúrio selecionada, foram amostrados em duplicata em períodos de tempo diferentes após 1, 2, 3 e 4 horas de incubação (Figura 16). No primeiro sistema de redução, em 1 hora de incubação, 45 % do mercúrio inicialmente adicionado no meio de cultura foi reduzido. No segundo sistema, em 2 horas de incubação, a remoção chegou a 68% do mercúrio inicial. Esse percentual de redução mercurial se manteve durante os períodos de 3 e 4 horas de incubação. Praticamente toda a massa de mercúrio que foi removida do primeiro impinger por atividade bacteriana, foi recuperada na solução de permanganato de potássio presente no segundo impinger, em cada um dos sistemas de redução nos diferentes tempos de incubação. Assim, a recuperação do mercúrio inicialmente adicionado (que consiste no somatório da concentração de mercúrio nos impingers 1 e 2) ao longo de todo o experimento sempre esteve próxima de 100 % (98 - 110 %). Enquanto que no sistema controle (Figura 17), sem bactéria, as concentrações de mercúrio tanto no impinger 1 quanto no impinger 2 não foram alteradas ao longo de toda experimentação (4 horas de incubação).

Esses resultados revelam que com o aumento do tempo de incubação, o percentual de mercúrio reduzido também aumenta. Entretanto a massa de Hg(II) reduzida tende a um valor máximo após certo período de tempo de incubação, nas condições testadas, após 2 horas. Uma das possíveis explicações para isso seria a diminuição da massa de mercúrio biodisponível no meio de cultura. Segundo essa hipótese, é possível que a bactéria tenha reduzido em 2 horas toda a fração de mercúrio biodisponível, ou seja, acessível à célula bacteriana. Assim, mesmo aumentando o tempo de incubação, os percentuais de redução não se alteram. Além dessa explicação, é possível considerar que as células bacterianas tenham alcançado um limite no *uptake* de mercúrio, ou seja, que as proteínas localizadas nas membranas celulares, responsáveis pela entrada dos íons de mercúrio na célula, tenham chegado a um ponto de saturação, conforme observaram Kiyono *et al.* (2003) em seu estudo envolvendo bactérias resistentes ao mercúrio.

Analisando as taxas de redução apresentadas é possível perceber a diminuição das mesmas ao longo de incubação. As taxas de redução em cada um dos sistemas foram: Sistema de 1 hora= 2,34 $\mu\text{M}/\text{h}$; Sistema de 2 horas= 1,79 $\mu\text{M}/\text{h}$; Sistema de 3 horas= 1,22 $\mu\text{M}/\text{h}$ e Sistema 4 horas= 0,93 $\mu\text{M}/\text{h}$. Quando comparamos as taxas de redução do primeiro sistema (1 hora) com o último (4 horas) notamos uma diminuição de 60,26%.

Resultados semelhantes aos nossos foram relatados por Nakamura *et al.* (1999) a partir do isolamento de bactérias resistentes ao mercúrio em amostras de sedimento. Nesse estudo, testou-se a capacidade de uma cepa resistente reduzir 5 μM Hg em um meio de cultura líquido. Em 24 horas de incubação,

aproximadamente 89% do mercúrio adicionado ao meio de cultura foi removido por atividade bacteriana, porém esse percentual de redução se manteve inalterado após 5 horas de incubação. Cursino *et al.* (2000) também observaram em um estudo semelhante que a reação de volatilização do mercúrio realizada por uma *E. coli* recombinante se esgota após 4 horas de incubação, quando atinge o percentual máximo de 70%. Esses resultados reforçam a idéia de que a capacidade de volatilização do mercúrio pela cepa bacteriana é limitada pela fração de mercúrio biodisponível presente no meio ou pela capacidade redutora da cepa testada.

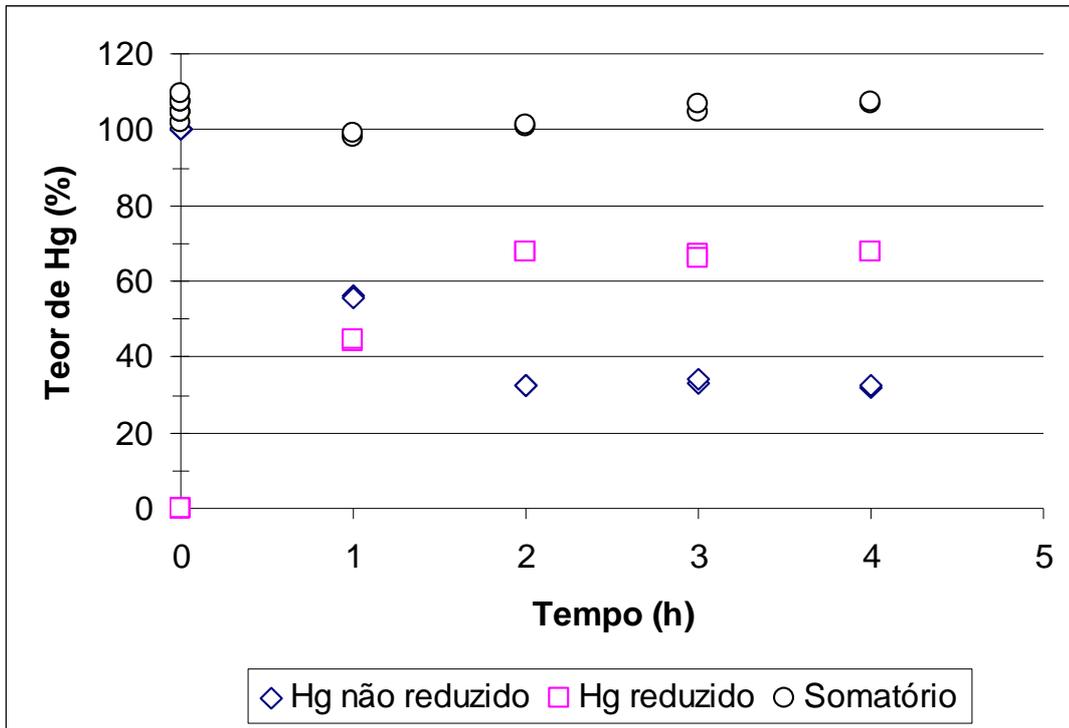


Figura 16 - Redução bacteriana de 5 μ M Hg em 4 horas de incubação.

D.O_{600nm} = 0,576.

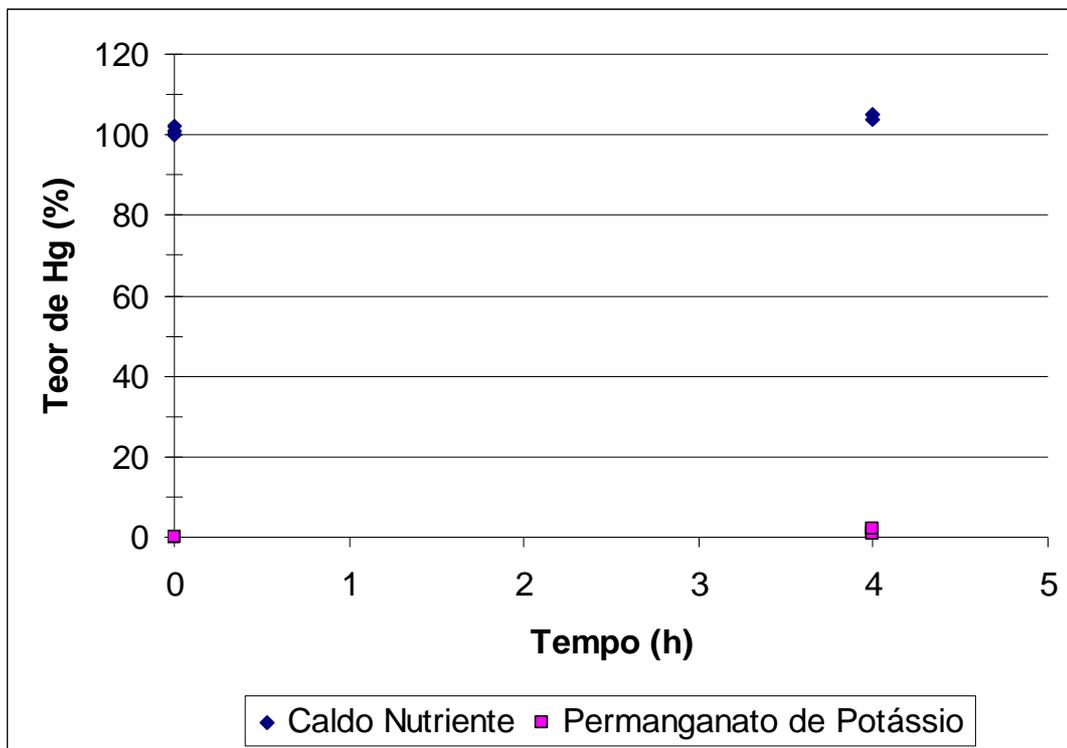
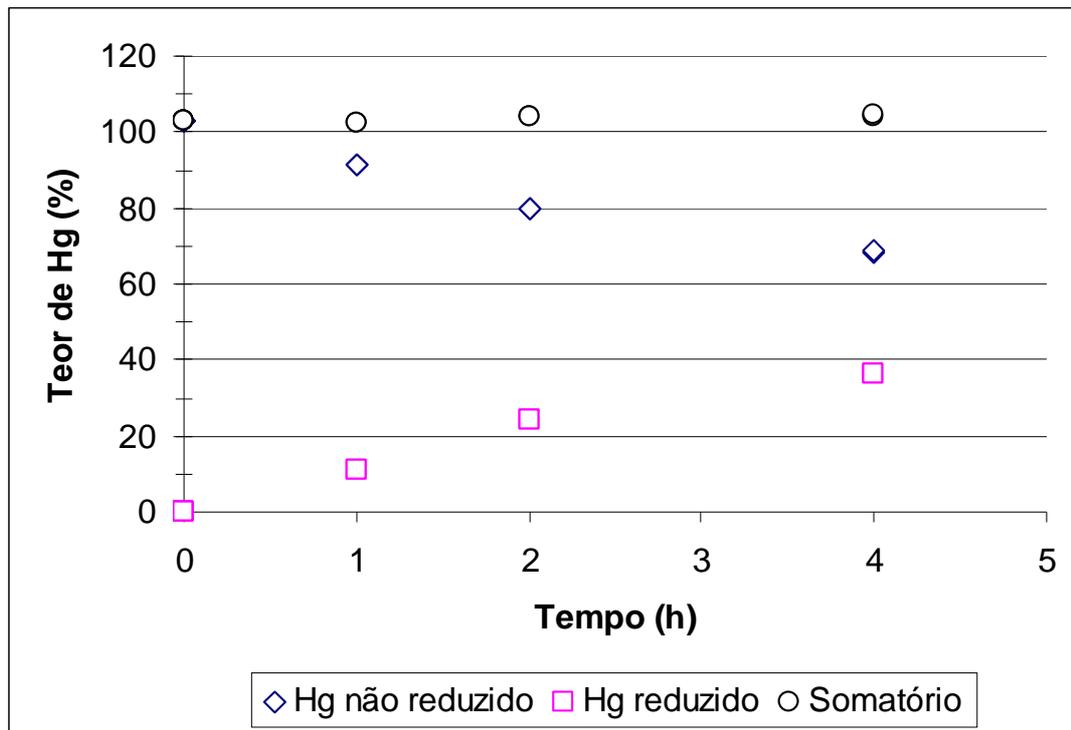


Figura 17 - Controles dos ensaios de volatilização bacteriana do Hg. Meio de cultura + Hg - Bactéria.

A segunda condição experimental testada foi a influência da concentração de mercúrio inicialmente adicionada ao meio de cultura. Durante este ensaio, testou-se uma concentração mercurial duas vezes maior do que a usada anteriormente (10 μM Hg). Em 1 hora de incubação, 12 % do mercúrio adicionado ao meio de cultura foi reduzido. Em 2 horas, o percentual de redução aumentou para 23 %. Por último, em 4 horas, 34 % do mercúrio adicionado ao meio de cultura tinham sido reduzidos (Figura 18). Ao contrário do ensaio anterior, em que o percentual de redução praticamente não se alterou após duas horas de incubação, quando

aumentamos a concentração de Hg adicionada (de 5 para 10 μM), o percentual de redução mercurial aumentou ao longo de todo o tempo do experimento. Houve aumentos de aproximadamente 11 % a cada hora de incubação. Esses resultados reforçam ainda mais a hipótese de que a questão da biodisponibilidade mercurial no meio de cultura é fundamental em ensaios de redução biológica do mercúrio. Isso porque quando aumentamos a concentração de mercúrio de 5 para 10 μM , também aumentamos a massa de mercúrio acessível às células bacterianas. O percentual de recuperação do mercúrio reduzido na solução de permanganato foi sempre próximo de 100 % (102 - 104 %). As taxas de redução no início do experimento foram semelhantes, tendendo a diminuir no final do experimento: Sistema de 1 hora = 1,25 $\mu\text{M}/\text{h}$; Sistema de 2 horas = 1,20 $\mu\text{M}/\text{h}$ e Sistema de 4 horas = 0,88 $\mu\text{M}/\text{h}$. Quando comparamos as taxas de redução do primeiro sistema (1 hora) com o último (4 horas) notamos uma diminuição de 29,6%.



Figuras 18 - Redução bacteriana de 10 μM Hg em 4 horas de incubação. D.O

$$D.O_{600\text{nm}} = 0,576.$$

A terceira condição experimental testada foi a influência do inóculo bacteriano inicial adicionado ao meio de cultura. O objetivo deste ensaio foi avaliar se o aumento do número de células bacterianas presentes no meio de cultura alteraria o processo de volatilização do mercúrio ao longo do tempo. Para isso foram montados sistemas de redução idênticos entre si, mesmo teor de Hg adicionado (5 μM), onde apenas a densidade óptica do inóculo inicial variou ($D.O_{600\text{nm}} = 0,31; 0,576$ e $0,653$), utilizada como uma medida indireta do número

inicial de bactérias no experimento ($D.O_{600nm} 0,50 = 1,0 \times 10^9$ UFC / mL). O sistema com D.O igual a 0,310 em uma hora de incubação reduziu 40% do mercúrio adicionado ao meio de cultura, aumentando apenas mais 9 % na segunda hora de experimento. Já o sistema com D.O igual a 0,576 em uma hora reduziu 45% do Hg inicial e chegou a 64% após 2 horas (aumento de 19%). Estes resultados são muito similares aos obtidos no primeiro teste utilizando condições experimentais análogas, sugerindo uma boa reprodutibilidade do experimento. Por fim, o sistema com D.O igual a 0,653 reduziu em uma hora 63% do mercúrio, o maior percentual. Entretanto na segunda hora do experimento este valor aumentou apenas 5 %, chegando a 68% (Figuras 19 e 20). Estes resultados sugerem que o sistema com maior número de células, embora do ponto de vista absoluto tenha reduzido a maior quantidade de Hg, já estava próximo de um platô. Coincidentemente o valor alcançado após 2 horas neste sistema é igual ao platô observado no primeiro experimento e muito semelhante ao obtido no sistema com inóculo inicial de 0,576. De fato, se observamos os resultados do segundo impinger, com permanganato, não é possível distinguir o teor de Hg recuperado de ambos os sistemas, reforçando a hipótese de uma convergência dos resultados a um limite máximo de redução bacteriana do mercúrio. Este limite é determinado provavelmente por um teor mínimo de Hg biodisponível no sistema, que será alcançado em diferentes tempos, dependendo do inóculo bacteriano adicionado e do teor de Hg inicial no meio. Note que a recuperação do mercúrio adicionado (somatório dos impingers 1 e 2) foi sempre superior a 95% (95 – 105%). As taxas de redução em cada um dos sistemas foram: Sistema de D.O 0,310 (1 hora) =

2,23 $\mu\text{M Hg}$ / hora; Sistema de D.O 0,310 (2 horas) = 1,31 $\mu\text{M Hg}$ / hora; Sistema de D.O 0,576 (1 hora) = 2,40 $\mu\text{M Hg}$ / hora; Sistema D.O 0,576 (2 horas) = 1,69 $\mu\text{M Hg}$ / hora; Sistema de D.O 0,653 (1 hora) = 2,81 $\mu\text{M Hg}$ / hora e Sistema de D.O 0,653 (2 horas) = 1,53 $\mu\text{M Hg}$ / hora.

Wiatrowski *et al.* (2006) avaliaram se a capacidade de volatilização de mercúrio é diferente quando comparamos bactérias anaeróbias e aeróbias. Para isso, cultivou-se as cepas em meios de cultura específicos para cada uma acrescido de 0,15 $\mu\text{M Hg}$. Após 24 horas de incubação observaram que em anaerobiose $68 \pm 3,7\%$ do mercúrio foi reduzido, enquanto que em aerobiose $65 \pm 9,1\%$. Neste trabalho, foi elucidada a importância do inóculo inicial no processo de redução do mercúrio. Isso porque foi observada uma correlação negativa entre a densidade de células bacterianas presentes no meio de cultura e a capacidade de redução bacteriana do mercúrio ao longo do tempo, que foi atribuída a bioadsorção do metal pela biomassa bacteriana. Por esse motivo não foram usados inóculos superiores a 1,0 ($\text{D.O}_{600\text{nm}}$). Por outro lado, tanto Cursino *et al.* (2000) quanto Chang & Hong (1995) relataram que inóculos baixos podem impedir ou dificultar o crescimento da cultura bacteriana em mercúrio. Isso porque, a concentração inicial de células acrescida ao meio de cultura deve ser suficiente para reduzir o mercúrio a níveis sub-tóxicos antes da morte das células.

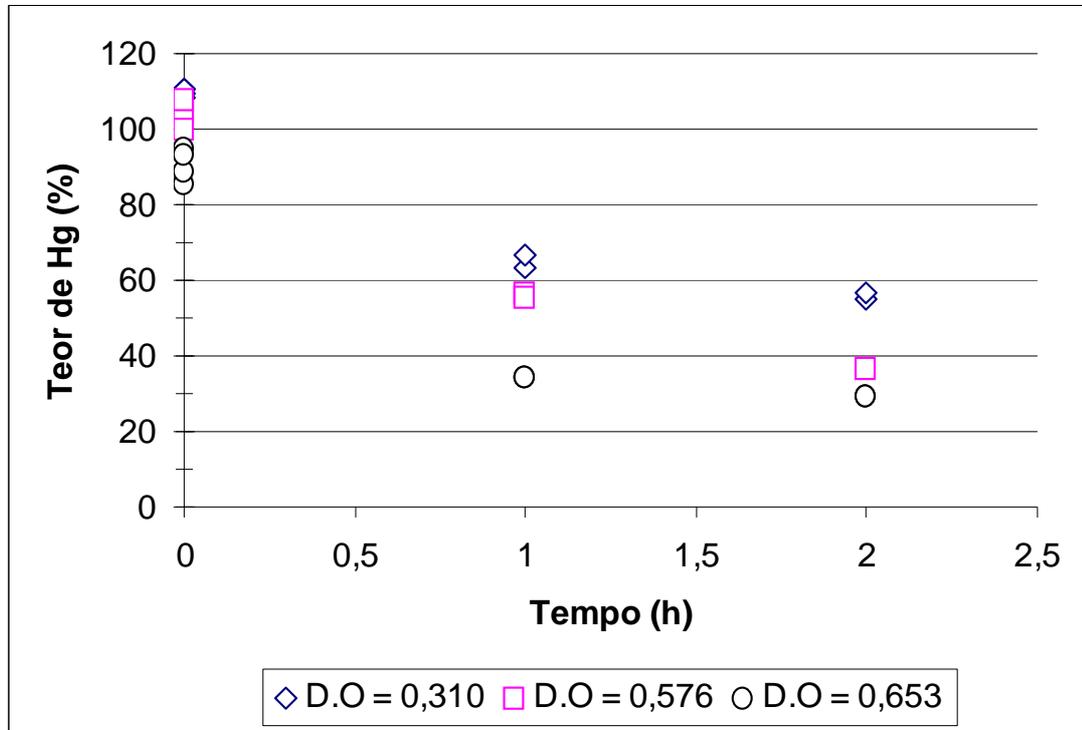


Figura 19 – Redução bacteriana de 5 µM Hg em 2 horas de incubação por diferentes inóculos bacterianos. O gráfico mostra a diminuição da concentração de Hg no meio de cultura Caldo Nutriente.

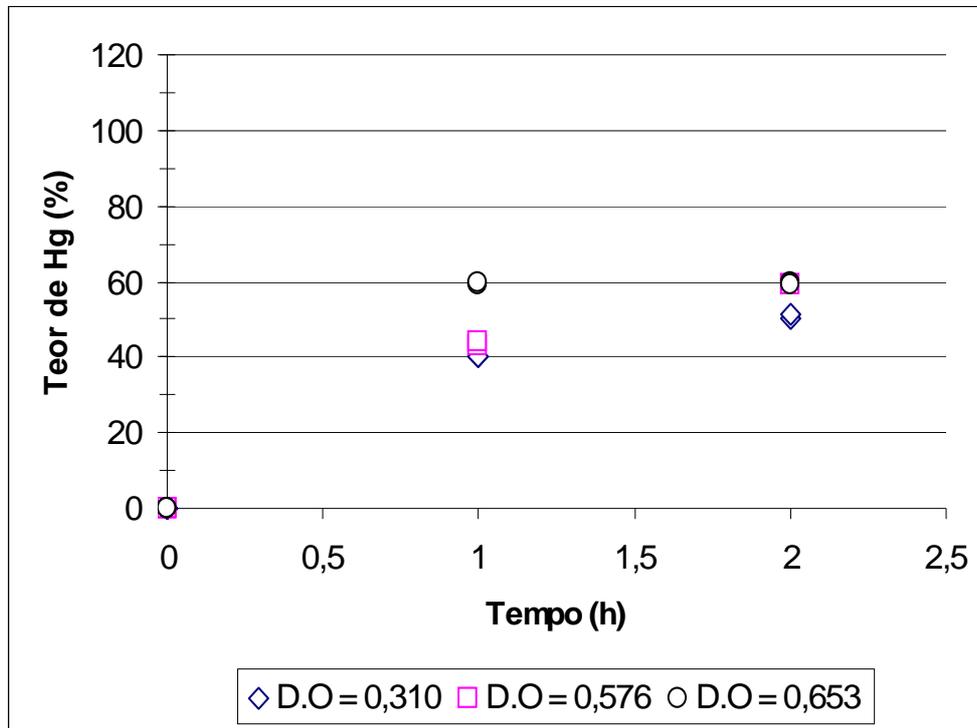


Figura 20 - Redução bacteriana de 5 μ M Hg em 2 horas de incubação por diferentes inóculos bacterianos. O gráfico mostra o aumento da concentração de Hg na solução de Permanganato de potássio.

6.0 – CONCLUSÃO

- Os ensaios para determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Seletiva (CMS), para avaliação da susceptibilidade bacteriana ao mercúrio em função do meio de cultura, para avaliação do efeito do DMSA e para determinação da Concentração de Mercúrio Mínima Inibitória (MIC) revelaram que a biodisponibilidade do mercúrio depende da composição do meio de cultura testado. Por isso, mais importante do que saber qual é a concentração total de mercúrio adicionada ao meio de cultura é saber qual fração desse metal tem efeito biológico, ou seja, é capaz de ultrapassar as membranas celulares.
- Em ambientes naturais, a biodisponibilidade do mercúrio também tem grande relevância. Isso porque as principais reações do ciclo biogeoquímico deste elemento (a metilação do Hg(II) e a redução do Hg(II) em Hg⁰) são catalisadas enzimaticamente no interior de células bacterianas e por isso, dependem da entrada de Hg(II) biodisponível.
- O isolamento de cepas bacterianas capazes de crescer em meio de cultura contendo mercúrio em todas quase todas as amostras de água coletadas nos diferentes ecossistemas aquáticos brasileiros corrobora estudos que apontam a ubiquidade da resistência bacteriana ao mercúrio independentemente dos níveis mercúrio no ambiente.

- A observação de uma correlação positiva entre elevados valores de MIC e a multi-resistência a antibióticos, em cepas bacterianas isoladas em amostras de água vindas do estado do Mato Grosso, corrobora diversos trabalhos da literatura que descrevem essa associação.
- A capacidade redutora da cepa bacteriana resistente testada nos ensaios de volatilização (cerca de 70% em duas horas) demonstra que o uso potencial desta cepa para remoção de mercúrio presente em soluções aquosas pode ser uma alternativa promissora.

7.0– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, S.L.; Cheung, W.K.W.; Janda, J.M. (2003) The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2348-2357.

Andrews, J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 5-16.

Ávila-Campos, M.J.; Carvalho, M.A.R.; Damasceno, C.A.V.; Chartone-Souza, E.; Cisalpino, E.O. (1991) Population stability in species of the *Bacteroides fragilis* group, under mercuric chloride action. *Revista de Microbiologia* 22: 93-96.

Azevedo, F.A. (2003) Toxicologia do mercúrio. RIMA São Paulo, 292 p. BRASIL.

Bakir, F.; Damluji, S.F.; Amin-Zaki, L.; Murthada, M.; Khalidi, A.; Al-Rawi, N.Y.; Dhahir, N.I.; Clarkson, T.W.; Smith, J.C.; Doherty, R.A. (1973) Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181: 230-241.

Bargagli, R.; Monaci, F.; Bucci, C. (2007) Environmental biogeochemistry of mercury in Antarctic ecosystems. *Soil Biology & Biogeochemistry* 39 (1): 352-360.

Barkay, T. & Schaefer, J. (2001) Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology* 4: 318-323.

Barkay, T.; Fouts, D.L.; Olson, B.H. (1985) Preparation of a DNA gene probe for detection of mercury resistance genes in gram-negative bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 49 (3): 686-692.

Barkay, T.; Miller, S. M.; Summers, A. O. (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 355-384.

Barrocas, P.R.G. (1994) Mercury Geochemistry in sediments of São João de Meriti river: Guanabara bay system, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação de mestrado. 132p. Universidade Federal Fluminense, Niterói.

Barrocas, P.R.G. (2003) Assessment of mercury (II) species bioavailability using a bioluminescent bacterial biosensor. Tese de doutorado. 197p. Florida State University, Tallahassee.

Batten, K.M. & Scow, K.M. (2003) Sediment microbial community composition and methylmercury pollution at four mercury mine-impacted sites. *Microbial Ecology* 46: 429-441.

Bauzá de Mirabó, F.M.; Thomas, A.; Rubi, E.; Forteza, R.; Cerda, V. (1997) Sequential injection analysis system for determination of mercury by cold-vapor atomic absorption spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 355: 203-210.

Benoit, J.M.; Gilmour C.C.; Mason R.P.; Heyes, A. (1999) Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. *Environmental Science & Technology* 33: 951-957.

Bitton, G. & Freihofner, V. (1978) Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium towards *Klebsiella aerogenes*. *Microbial Ecology* 4: 119-125.

Bonzongo, J.C.J. & Donkor, A.K. (2003) Increasing UV-B radiation at earth's surface and potential effects on aqueous mercury cycling and toxicity. *Chemosphere* 52: 1263-1273.

Boscolo, M.; Antonucci, S.; Volpe, A.R. (2009) Acute mercury intoxication and use of chelating agents. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 23 (4): 217-223.

Bridges, C.C.; Josheee, L.; Zalups, R.K. (2009) Effect of DMPS and DMSA on the placental and fetal disposition of methylmercury. *Placenta* 30 (9): 800-805.

Chang, J. & Hong, J. (1995) Estimation of kinetics of mercury detoxification from low-inoculum batch cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64). *Journal of Biotechnology* 42: 85-90.

Chen, S. & Wilson, D.B. (1997) Genetic engineering of bacteria and their potential for Hg²⁺ bioremediation. *Biodegradation* 8: 97-103.

Cursino, L.; Mattos, S.; Azevedo, V.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A.M.A. (2000) Capacity of mercury volatilization by mer (from *Escherichia coli*) and glutathione S-transferase (from *Schistosoma mansoni*) genes cloned in *Escherichia coli*. *The Science of the Total Environmental* 109-113.

Cursino, L.; Mattos, S.V.M.; Silva, N.O.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A.M.A. (2003) Measurement of volatilized mercury by a mini-system: a simple, reliable and reproducible technique. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (4): 731-734.

Cursino, L.; Oberdá, S.M.; Cecílio, R.V.; Moreira, R.M.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A.M.A. (1999) Mercury concentration in the sediment at different gold prospecting sites along the Carmo stream, Minas Gerais, Brazil, and frequency of resistant bacteria in the respective aquatic communities. *Hydrobiologia* 394: 5–12.

De, J.; Ramaiah, N.; Vardanyan, L. (2008) Detoxification of toxic metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Marine Biotechnology* 10: 471-477.

Dien, B.; Cotta, M.; Jeffries, T. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology Biotechnology* 63 (3): 258–66.

Doering, W.E.; James, R.R.; Echols, R.T. (2000) A sequential injection cold-vapor atomic absorption method for the determination of total mercury. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368: 475-479.

Earl, A.M.; Losick, R.; Kolter, R. (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* 16 (6): 269-275.

Ekino, S.; Susa, M.; Ninomiya, T. (2007) Minamata diseases revisited: Na update on the acute and chronic in if a stations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences* 262 (1-2): 131-144.

Ekstrom, E.B.; Morel, F.M.M.; Benoit, J.M. (2003) Mercury methylation independent of the Acetyl-Coenzyme A pathway in sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5414-5422.

EPA (1994) Method 245.1: Determination of Mercury in Water by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry (CVAA). Disponível em <http://www.epa.gov/sam/pdfs/EPA-245.1.p>. Acessado em 10/06/2008.

Eto, K. (1997) Pathology of Minamata disease. *Toxicology Pathology* 25 (6): 614-623.

Farrell, R.E.; Germida, J.J.; Huang, M. (1993) Effects of chemical speciation in growth media on the toxicity of mercury (II). *Applied and environmental microbiology* 59 (5): 1507-1504.

FEEMA (1985) Levantamento de metais pesados no estado do Rio de Janeiro: Segundo relatório trimestral. FEEMA/Rio de Janeiro.

Felske, A D.M.; Fehr, W.; Pauling, B.V.; von Canstein, H.; Wagner-Dobler, I. (2003). Functional profiling of mercury reductase (*merA*) genes in biofilm communities of a technical scale biocatalyzer. *BMC Microbiology* 3 (22): 1-11.

Fitzgerald, W.F.; Engstrom, D.R.; Mason, R.P.; Nater, E.A. (1998) The Case for Atmospheric Mercury Contamination in Remote Areas. *Environmental Science Technology* 32 (1): 1-7.

Fujihara, M.; Maeda, K.; Sasamori, E.; Matsushita, M.; Harasawa, R. (2009) Effects of chelating reagents on colonial appearance of *Paenibacillus alvei* isolated from canine oral cavity. *Journal of Veterinary Medicine Science* 71 (2): 147-153.

Gadd, G.M. (1992) Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters* 100: 197-204.

Ghosh, S.; Sadhukhan, P.C.; Gosh, D.K.; Mandal, A.K.; Chaudhuri, J.; Madal, A. (1996) Studies on the effect of mercury and organomercurial on the growth and nitrogen fixation by mercury-resistant *Azobacter* strains. *Journal of Applied Bacteriology* 80: 319-326.

Golding, G.R.; Kelly, C.A.; Sparling, R.; Loewen, P.; Barkay, T. (2007) Evaluation of mercury toxicity as a predictor of mercury bioavailability. *Environmental Science Technology* 41: 5685-5692.

Goni-Urriza, M.; Pineau, L.; Capdepuy, M.; Roques, C.; Caumette, P.; Quentin, C. (2000) Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. Isolated from two European rivers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 297-301.

Graeme, A.K. & Pollack, C.V. (1998) Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *Journal of Emergency Medical* 16: 45–56.

Gram, H.C. (1884). "Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten" (in German). *Fortschritte der Medizin* 2: 185–9.

Gupta, N. & Ali, A. (2004) Mercury volatilization by R factor systems in *Escherichia coli* isolated from aquatic environments of India. *Current Microbiology* 48:88–96.

Gustin, M.S.; Taylor, G.E.; Leonard, T.L. (1996) Atmospheric mercury concentrations associated with geologically and anthropogenically enriched sites in central western Nevada. *Environmental Science & Technology* 30 (8): 2572-2579.

Hacon, S.; Campos, R.C.; Farias, R. (2008) The predictive factors for mercury contamination in fish farming areas in the north region of Mato Grosso, Amazon Basin. *Epidemiology* 19 (6): S367-S368.

Hacon, S.; Barrocas, P.R.G; Vasconcellos, A.C.S.; Barcellos, C.; Wasserman, J. C.; Campos, R.C; Ribeiro, C.; Azevedo-Carlioni, F.B. (2008) An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 24(7):1479-1492.

Hammond, C. R. (2000). The Elements, in Handbook of Chemistry and Physics. 81^o edição, CRC press

Harnett, N. M. & Gyles, C.L. (1983) Enterotoxigenicity of bovine and porcine *Escherichia coli* of groups 8, 9, 20, 64, 101 and X46. *American Journal Veterinary Research* 44:1210-1214.

Hart, M.; Elliott, G.N.; Osborn, M.; Ritchie, D.A.; Strike, P. (1998) Diversity amongst *Bacillus merA* genes amplified from mercury resistant isolates and directly from mercury polluted soil. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 73-84.

Hassen, A.; Saidi, N.; Cherif, M.; Boudabous, A. (1998) Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology* 64: 7-15.

Heller, L. (1998) Relação entre saúde e saneamento na perspectiva do desenvolvimento. *Ciência e Saúde Coletiva* 3 (2): 73-84.

Helmann, J.D.; Wang, Y.; Mahler, I.; Walsh, C.T. (1989) Homologous metalloregulatory proteins from both gram-positive and gram-negative bacteria control transcription of mercury resistance operons. *Journal of Bacteriology* 171: 222–229.

Hobman, J.L. & Brown, N.L. (1997) Bacterial mercury–resistance genes. In: Sigel, H.; Sigel, A. (eds) *Metal ions in biological systems*, vol. 34, pp 527–568, Dekker, New York.

Högenauer, C.; Langner, C.; Beubler, E. (2006). *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *New England Journal Medicine* 355 (23): 2418–26.

Honda, S.; Hylander, L.; Sakamoto, M. (2006). Recent advances in evaluation of health effects on mercury with special reference to methylmercury: A minireview. *Environmental Health and Preventive Medicine* 11(4): 171-176.

Horn, J.M.; Brunke, M.; Deckwer, W.D.; Timmis, K. (1994) *Pseudomonas putida* strains which constitutively overexpress mercury resistance for bioremediation of organomercurial pollutants. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1): 357-362.

Huang, C.C.; Narita, M.; Yamagata, T.; Endo, G. (1999). Identification of three *merB* genes and characterization of a broad-spectrum mercury resistance module encoded by a class II transposon of *Bacillus megaterium* strain MB1. *Gene* 239: 361-366.

Hughes, M.N. & Poole, R.K. (1991) Metal speciation and microbial growth - the hard (and soft) facts. *Journal of General Microbiology* 137: 725-734.

Jaisankar, D.; Sarkar, A.; Ramaiah, N. (2006) Bioremediation of toxic substances by mercury resistant marine bacteria. *Ecotoxicology* 15: 385-389.

Kehrig, H.A.; Costa, M.; Moreira, I.; Malm, O. (2002) Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. *Marine Pollution Bulletin* 44: 1018-1023.

Kehrig, H.A.; Pinto, F.N.; Moreira, I.; Malm, O. (2003) Heavy metals and methylmercury in a tropical coastal estuary and a mangrove in Brazil. *Organic Geochemistry* 34: 661-669.

King, J.K.; Harmon, S.M.; Fu, T.T.; Gladden, J.B. (2002) Mercury removal, methylmercury formation, and sulfate reducing bacteria profiles in wetland mesocosms. *Chemosphere* 46: 859-870.

Lacerda, L.D. & Pfeiffer, W. (2008). Mercury from gold mining in the Amazon environment - An overview. *Química Nova* 15 (2): 155-160.

Li, P.; Feng, X.B.; Qiu, G.L. (2009) Mercury pollution in Asia: a review of the contaminated sites. *Journal of Hazardous Materials* 168 (2-3): 591-601.

Liebert, C.A.; Wireman, J.; Smith, T.; Summers, A.O. (1997) Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Applied Environmental Microbiology* 63 (3): 1066-1076.

Lilley, A.K.; Bailey, M.J.; Day, M.J.; Fry, J.C. (1996). Diversity of mercury resistance plasmids obtained by exogenous isolation from bacteria of sugar beet in three successive years. *FEMS Microbiology Ecology* 20: 211-227.

Lima-Bittencourt, C.I; Cursino, L.; Gonçalves-Dornelas, H.; Pontes, D.S; Nardi, R.M.D; Callisto, M.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A.M.A. (2007) Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater. *Genetic Molecular Research* 6 (3):510-521.

Machado, W.; Moscatelli, M.; Rezende, L.G.; Lacerda, L.D. (2002) Mercury, zinc, and copper accumulation in mangrove sediments surrounding a large landfill in southeast Brazil. *Environmental Pollution* 120: 455-461.

Malik, A. & Jaiswal, R. (2000) Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 177-182.

Malm, O. & Pfeiffer, W. (1990) Mercury pollution due to gold mining in the Madeira river Basin, Amazon / Brazil. *Ambio* 19 (1): 11-5.

Mason, R.P.; Fitzgerald, W.P; Morel, F.M.M. (1994) The biogeochemical cycling of elemental mercury—anthropogenic influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58: 3191–3198.

Mason, R.P.; Morel, F.M.M.; Hemond, H.F (1995) The role of microorganisms in elemental mercury formation in natural waters. *Water, Air and Soil Pollution* 80 (1-4): 775-787.

Mason, R.P.; Reinfelder, J.R.; Morel, F.M.M. (1996) Uptake, toxicity and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environmental Science & Technology* 30: 1835-1845.

Mazel, D.; Dychinco, B.; Webb, V.A.; Davies, J. (2000) Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44:1568-74.

Mindlin, S.; Minakhin, L.; Petrova, M.; Kholodii, G.; Minakhina, S.; Gorlenko, Z.; Nikiforov, V. (2005) Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since Upper Pleistocene. *Research in Microbiology* 156: 994-1004.

Moore, B. (1960). A new screen test and selective medium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* ii: 453.

Morel, F.M.M.; Kraepiel, A.M.L.; Amyot, M. (1998) The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 543-566.

Murtaza, I.; Dutt, A.; Ali, A. (2002) Relationship between the persistence of *mer* operon sequences in *Escherichia coli* and their resistance to mercury. *Current Microbiology* 44: 178-183.

Najera, I.; Lin, C.; Kohbodi, G.A.; Jay, J.A. (2005) Effect of chemical speciation on toxicity of mercury to *Escherichia coli* biofilms and planktonic cells. *Environmental Science Technology* 39: 3116–3120.

Nakahara, H.; Ishikawa, T.; Sarai, Y.; Kondo, I.; Kozukue, H.; Mitsuhashi, S. (1977) Mercury resistance and R plasmids in *Escherichia coli* isolated from clinical lesions in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11 (6): 999-1003.

Nakahara, H.; Ishikawat, T.; Sarai, Y.; Kondo, I.; Kozukue, H.; Silver, S. (1977) Linkage of mercury, cadmium and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 975-976.

Nakamura, K. & Nakahara, H. (1988) Simplified X-ray film method for detection of bacterial volatilization of mercury chloride by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (11): 2871-2873.

Nakamura, K.; Hagimine, M.; Sakai, M.; Furukawa, K. (1999) removal of mercury from mercury-contaminated sediments using a combined method of chemical leaching and volatilization of mercury by bacteria. *Biodegradation* 10: 443-447.

Narita, M.; Chiba, K.; Nishizawa, H.; Ishii, H.; Huang, C.; Kawabata, Z.; Silver, S.; Endo, G. (2003) Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay. *FEMS Microbiology Letters* 223: 73-82.

NCCLS. (2003) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard — Eighth Edition. NCCLS M2-A8. USA.

Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 730-750.

Ojo, K.K.; Tung, D.; Luis, H.; Bernardo, M.; Leitão, J.; Roberts, M.C. (2004) Gram-positive *merA* gene in gram-negative oral and urine bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 238: 411-416.

Osborn, A.M.; Bruce K.D.; Strike P.; Ritchie, D.A. (1997) Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 239-262.

Osterblad, M.; Leistevuo, J.; Leistevuo, T.; Jarvinen, H.; Pyy, L.; Tenovuo, J.; Huovinen, P. (1995) Antimicrobial and mercury resistance in aerobic gram-negative bacilli in fecal flora among persons with and without dental amalgam fillings. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (11): 2499-2502.

Pfeiffer, W.C. & Lacerda, L.D. (1988) Mercury inputs into the Amazon region, Brazil. *Environmental Technological Letters* 9: 325-330.

Pfeiffer, W.C.; Lacerda, L.D.; Malm, O.; Souza, C.M.M.; Silveira, E.G.; Bastos, W.R. (1989) Mercury concentrations in Inland Waters of Gold Mining Areas in Rondonia, Brazil. *The Science of the Total Environment* 87/88: 233-240.

Pike, R.; Stapleton, P.; Lucas, V.; Roberts, G.; Rowburry, R.; Richards, H.; Mullany, P.; Wilson, M. (2002) Effect of medium composition on the susceptibility of oral Streptococci to Mercuric Chloride. *Current Microbiology* 45: 272-276.

Podschun, R. & Ullmann, U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews* 11 (4): 589-603.

Queiroz, I.R. (1995) Determinação de metilmercúrio em peixes de região de garimpo. Dissertação de mestrado. 109p. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ramaiah, N. & De, J. (2003) Unusual rise in mercury-resistant bacteria in coastal environs. *Microbial Ecology* 45 (4): 444-454.

Ramamoorthy, S. & Kushner, D.J. (1975) Binding of mercuric and other heavy metal ions by microbial growth media. *Microbial Ecology* 2: 162-176.

Rasmussen, L.D. & Sorensen, S.J. (1998). The effect of longterm exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. *Current Microbiology* 36: 291-297.

Rooney, R.C. (1976) Use of sodium borohydride for cold-vapour atomic absorption determination of trace amounts of inorganic mercury. *Analyst* 101: 678-682.

Ross, M.A. (1996) Methylmercury. *Healthy Effects Review* 1: 1-2.

Roulet, M. & Lucotte, M. (1995) Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralit soils of tropical rain forest in French Guiana, South America. *Water, air and soil pollution* 80: 1079-1088.

Rush, T.; Hjelmhaug, J.; Lobner, D. (2009). Effects of chelators on mercury, iron, and lead neurotoxicity in cortical culture. *Neurotoxicology* 30 (1): 47-51.

Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1: 9-20.

Schaefer, J.K; Yagi, J.; Reinfelder, J.R.; Cardona, T.; Ellickson, K.M.; Barkay, T. (2004) Role of the bacterial organomercury lyase (MerB) in controlling methylmercury accumulation in mercury contaminated natural waters. *Environmental Science Technology* 38: 4304-4311.

Silver, S. & Phung, L.T. (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Review of Microbiology* 50: 753-789.

Smalla, K. & Sobczyk, P.A. (2002) The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 142-175.

Stillman, J. M. (2003). Story of Alchemy and Early Chemistry. Kessinger Publishing. pp. 7–9. Disponível em <http://books.google.com/books>. Acessado em 15/01/2010.

Stock, I.; Burak, S.; Wiedemann, B. (2004) Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adenocarboxylata* strains. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 10: 724-733.

Vetriani, C.; Chew, Y.S.; Miller, S.M.; Yagi, J.; Coombs, J.; Lutz, R.A.; Barkay, T. (2005) Mercury Adaptation among Bacteria from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1): 220–226.

Wagner-Döbler I.; von Canstein H. F.; Li Y., Timmis K. N.; Deckwer W.D. (2000) Removal of mercury from chemical wastewater by microorganisms in technical scale. *Environmental Science & Technology* 34: 4628-4634.

Wagner-Döbler, I.; Lündorf, H.; Lübbehüsen; von Canstein, H.F.; Li, Y. (2000) Structure and species composition of mercury-reducing biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 66: (10) 4559-4563.

Wasserman, J.C.; Freitas-Pinto, A.A.P.; Amouroux, D. (2000) Mercury Concentrations in Sediment Profiles of a Degraded Tropical Coastal Environment. *Environmental Technology* 21 (3): 297-305.

Wasserman, J.C.; Hacon, S.; Wasserman, M.A. (2003) Biogeochemistry of mercury in the Amazonian environment. *AMBIO* 32 (5): 336-342.

Wasserman, J.C.; Campos, R.C.; Hacon, S. (2008) Mercury in soils and sediments from gold mining liabilities in southern Amazonia. *Quimica Nova* 30 (4): 768-773.

Wiatrowski, H.A.; Hard, P.M.; Barkay, T. (2006) Novel reduction of mercury (II) by mercury-sensitive dissimilatory metal reducing bacteria. *Environmental Science Technology* 40: 6690-6696.

Wieser, M. & Busse, H. (2000) Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1087-1093.

Zagar, D. (2007) Modelling of mercury transport and transformations in the water compartment of the Mediterranean Sea. *Marine Chemistry* 107: 64-88.

Zeroual, Y.; Moutaouakkil, A.; Blaghen, M. (2001) Volatilization of mercury by immobilized bacteria (*Klebsiella pneumoniae*) in different support by using fluidized bed bioreactor. *Current Microbiology* 43: 322-327.

Zscheck, K.K. & Murray, B.E. (1990) Evidence for a staphylococcal like mercury resistance gene in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 34: 1287-1289.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)