

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



***“Tolerância bacteriana ao mercúrio relacionada com a atividade da enzima mercúrio redutase”***

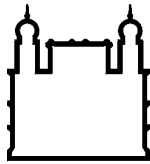
*por*

***Adriana de Lima Almeida Bezerra***

*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 2012*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

*Esta dissertação, intitulada*

***“Tolerância bacteriana ao mercúrio relacionada com a atividade da enzima mercúrio redutase”***

*apresentada por*

***Adriana de Lima Almeida Bezerra***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof. Dr. Sérgio Rabello Alves

Prof. Dr. Jaime Lopes da Mota Oliveira

Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas – Orientador

*Dissertação defendida e aprovada em 16 de março de 2012.*

Catálogo na fonte  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

B574 Bezerra, Adriana de Lima Almeida  
Tolerância bacteriana ao mercúrio relacionada com a atividade  
da enzima mercúrio redutase. / Adriana de Lima Almeida Bezerra.  
-- 2012.  
49 f. : il. ; tab. ; graf.  
  
Orientador: Barrocas, Paulo Rubens Guimarães  
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública  
Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2012  
  
1. Bactérias. 2. Mercúrio. 3. Mercúrio Redutase. I. Título.

CDD - 22.ed. – 615.925663

*Dedico essa dissertação de mestrado aos que me ensinaram o valor do trabalho, do respeito ao próximo e o valor dos compromissos assumidos: meus pais!*

*Ao meu marido e ao meu filho querido, pelos momentos de descontração, que serviram de combustível para continuar nesta jornada.*

## **Agradecimentos**

- Agradeço a Deus pela fé que tenho, pelo suporte espiritual nos momentos de desânimo, por fortalecer o dom da paciência e impedir o desespero pelo qual todo estudante passa.
- Agradeço, especialmente, aos meus pais, Antonio, pelo apoio incondicional, por acreditar que sua filha pode realizar tudo que sonhar, e a minha mãe Maria Helena, por me trazer para a realidade e por me dar todo o suporte logístico, cuidando do meu filho nas horas que precisei ler, escrever, ficar até mais tarde no laboratório etc.
- Ao meu orientador Paulo Rubens, por toda dedicação, ensinamentos, ajuda e por nossas reuniões. Obrigada por ter me ensinado tantas coisas.
- Ao professor Moacelio por todo suporte, ensinamento, compreensão e nossas longas conversas durante as etapas desta jornada. Muito Obrigada.
- Aos meus amigos de laboratório Ana Claudia, Sheila Duque, Thiago Figueiredo e Raquel Rebello por todos os momentos de alegria, apoio e amizade que passamos juntos.
- Aos funcionários do DSSA, em especial, aos técnicos, pelo suporte para uso dos equipamentos e laboratório, a Ana Rodrigues pelo incentivo diário e apoio nos memorandos de autorização para entrada no laboratório.
- Ao CESTEJ, nas pessoas do Prof. Moacelio e Prof. Sergio Rabelo, disponibilizando o uso de equipamentos e suporte técnico.
- Ao DCB pela acolhida e parceria, em especial a Prof<sup>a</sup> Adriana Régua sempre muito atenciosa.
- A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho estivesse aqui hoje.

## Resumo

Estudos de tolerância ao mercúrio com *Pseudomonas* e exemplares da família *Enterobacteriaceae* sugerem que existe alguma ligação genética entre a resistência ao mercúrio e a resistência a alguns antibióticos, como ampicilina e estreptomicina. Pesquisas realizadas com bactérias resistentes ao mercúrio sugerem que a pressão seletiva ambiental e a transferência horizontal de genes, comum entre as bactérias, desempenharam um papel fundamental na distribuição da resistência ao mercúrio. A redução enzimática de mercúrio e de organomercuriais é o mecanismo de resistência mais bem estudado, ocorrendo em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, de origem ambiental ou clínica. Este mecanismo de resistência envolve o operon *mer* que codifica uma série de proteínas, especialmente a enzima mercúrio redutase (MerA; EC 1.16.1.1), responsável pela redução catalítica do mercúrio. Bactérias com este gene estão envolvidas nos ciclos biogeoquímicos do mercúrio e podem ser usadas na sua biorremediação. Neste trabalho isolamos bactérias tolerantes ao mercúrio do meio ambiente das cinco regiões brasileiras na busca de um exemplar com potencial para uso em biorremediação. Para este uso é preciso ter como critérios de seleção que a bactéria tenha o gene *merA* e expresse a enzima MerA em quantidades apreciáveis. Neste trabalho foi possível isolar bactérias tolerantes a 5µM de mercúrio de todas as regiões do Brasil. Dentre as bactérias isoladas, foram selecionadas as amostras Gram-negativas com maior nível de tolerância ao Hg(II) e que demonstraram sensibilidade aos antibióticos mais comuns. Seguindo estes critérios, foi selecionada uma única amostra, identificada como *Leclercia adecarboxilata* M23, para investigar a relação entre a resistência ao mercúrio e os níveis de MerA. Os resultados mostraram que a determinação quantitativa desta enzima é um processo trabalhoso que ainda não está totalmente consolidado. Apesar do processo de lise celular não ter sido o mais adequado, os extratos celulares obtidos por agitação com pérolas de vidro permitiram demonstrar a presença de MerA nos extratos de *L. adecarxilata* M23 e de *Escherichia coli* ATCC 35218, amostras genotipadas por PCR como positivas para *merA*. Em contraste, no extrato da amostra de *E.coli* ATCC 23724, que não apresentou banda correspondente ao gene *merA*, não foi possível detectar qualquer atividade de MerA. A determinação de MerA pelo decaimento dos níveis de NADPH, medido através da absorção de luz a 340nm, gera problemas analíticos de difícil solução, já que o mercúrio reage com o NADPH mudando a sua absorvibilidade neste comprimento de onda. Estas reações acontecem nos primeiros minutos de reação, implicando na necessidade de esperar algum tempo antes de considerar o decaimento da absorção de luz como uma medida quantitativa da atividade da enzima. Estes problemas podem ser contornados com a determinação da enzima pelo consumo de mercúrio iônico ou pela volatilização deste metal, até mesmo por células intactas, como pode ser demonstrado por avaliação de resultados da literatura. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a determinação quantitativa da atividade de MerA em extratos bacterianos não é um bom critério de seleção de bactérias para biorremediação. O comportamento de células em fase exponencial de crescimento expostas a concentrações crescentes de mercúrio, metodologia denominada neste trabalho como “desafio com mercúrio”, foi capaz de demonstrar que as amostras bacterianas MerA<sup>+</sup> apresentam um comportamento diferente da amostra MerA<sup>-</sup>. O comportamento ideal de uma bactéria seria aquele capaz de tolerar a adição do mercúrio na fase exponencial de crescimento celular sem alteração da velocidade específica de crescimento, fato possível de ser encontrado na literatura, e que identificaria a amostra bacteriana com maior potencial para uso em biorremediação.

**Palavras chave:** bactérias; mercúrio; MerA; mercúrio redutase; biorremediação.

## Abstract

Studies of tolerance to mercury with *Pseudomonas* and specimens of the family Enterobacteriaceae suggest that there is some genetic link between mercury resistance and resistance to some antibiotics such as ampicillin and streptomycin. Research conducted with bacteria resistant to mercury suggests that selective pressure on the environment and horizontal gene transfer, common among bacteria, have played a key role in the spread of mercury resistance in bacterial communities. The enzymatic reduction of mercury is the best studied resistance mechanism, occurring in Gram-negative and Gram-positive bacteria, of clinical or environmental origin. This mechanism of resistance involves the *mer* operon that encodes a series of proteins, especially the enzyme mercury reductase (MerA, EC 1.16.1.1), responsible for the catalytic reduction of mercury. Bacteria with this gene are involved in Hg biogeochemical cycle and can be used for its bioremediation. In this work, mercury tolerant bacteria were isolated from the environment of the five Brazilian regions, in the search of a specimen with potential for bioremediation use. To be used in this process the bacteria must have the gene *merA* and must express the enzyme MerA in appreciable levels. It was possible to isolate bacteria tolerant to 5µM of mercury from all regions of Brazil. Among isolated bacteria, it was selected Gram-negative samples with higher tolerance to Hg(II) and sensibility to most common antibiotics. Following these criteria, it was selected a single sample, identified as *Leclercia adecarboxilata* M23, to investigate the relationship between resistance levels of mercury and MerA activity. The results showed that quantitative determination of this enzyme is a laborious process that is not yet fully consolidated. Even though the process of cell lyses was not the most appropriate, the cell extracts obtained by shaking cells with glass beads allowed to demonstrate the presence of MerA in the extracts of *L.adecarxilata* M23 and *Escherichia coli* ATCC 35218, which were genotyped by PCR as positive for *merA*. In contrast, in the extract of *E. coli* ATCC 23724, which showed no band corresponding to *merA* gene, it was not possible to detect any activity of MerA. MerA determination by NADPH decay, measured by light absorption at 340nm, has analytical problems difficult to solve, since mercury reacts with NADPH changing its absorptivity at this wavelength. These reactions occur in the first minutes of reaction, implying the need to wait some time before considering the decay of light absorption as a quantitative measure of enzyme activity. These problems can be avoided assaying enzyme by ionic mercury decay or by mercury volatilization, even using intact cells, as can be demonstrated by the data in the literature. The results of this work indicate that quantitative determination of MerA activity in bacterial extracts is not a good criterion for bacteria selection for bioremediation. The behavior of cells in exponential growth phase exposed to increasing concentrations of mercury, methodology called "challenge with mercury", was able to demonstrate that bacterial samples MerA<sup>+</sup> have a behavior difference. The ideal behavior would be a bacterium able to tolerate the addition of mercury in the exponential phase of cell growth without changing the specific growth rate, which has been described in the literature, identifying the bacterial sample with the greatest potential for use in bioremediation.

**Keywords:** bacteria; mercury; MerA; mercury reductase; bioremediation.

## Listas de Tabelas e Figuras

<b>Tabela 1</b> – Distribuição das coletas e dos isolamentos para cada Região do Brasil.....	19
<b>Tabela 2</b> - Distribuição dos gêneros das amostras isoladas tolerantes às maiores concentrações de mercúrio. ....	21
<b>Tabela 3</b> – Antibiograma das bactérias isoladas Gram-negativas e tolerantes a pelo menos 30µM de mercúrio .....	22
<b>Tabela 4</b> – Tempos de geração (min) dos crescimentos exponenciais expressos na Figura 2. ....	23
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros das determinações de Tempo de Geração expressas na Figura 4. ....	27
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros da determinação de atividade da enzima mercúrio redutase da fração solúvel de bactérias Gram-negativas. ....	33
<b>Tabela 7</b> - Parâmetros do recálculo das Figuras 2 e 4 de Takeushi <i>et al</i> (1999) através das Regressões Lineares expressas na Figura 11.....	42
<b>Figura 1</b> - Distribuição geográfica e tolerância ao mercúrio das 143 bactérias isoladas nas diversas regiões do Brasil.....	21
<b>Figura 2</b> – Desafio de células bacterianas em crescimento exponencial com Hg(II). ....	23
<b>Figura 3</b> - Genotipagem de cepas bacterianas para o gene <i>merA</i> .....	24
<b>Figura 4</b> - Produção de biomassa de bactérias Gram-negativas.....	26
<b>Figura 5</b> - Lise da biomassa com pérolas de vidro. ....	27
<b>Figura 6</b> - Rendimento de geração de proteína solúvel depois do tratamento das biomassas bacterianas com pérolas de vidro e Vortex.....	28
<b>Figura 7</b> - Avaliação fotométrica do curso da reação da enzima mercúrio redutase presente na fração solúvel da amostra isolada M23 ( <i>Leclercia adecarboxylata</i> ) cultivada na ausência (A) e na presença (B) de mercúrio.....	29
<b>Figura 8</b> - Avaliação fotométrica do curso da reação da enzima mercúrio redutase presente na fração solúvel da amostra ATCC 35218 ( <i>Escherichia coli</i> ) cultivada na ausência (A) e na presença (B) de mercúrio.....	30
<b>Figura 9</b> - Avaliação fotométrica do curso da reação da enzima mercúrio redutase presente na fração solúvel da amostra ATCC 23724 ( <i>Escherichia coli</i> ) cultivada na ausência de mercúrio.....	31
<b>Figura 10</b> - Avaliação fotométrica do meio reacional para a determinação da enzima mercúrio redutase. ....	32
<b>Figura 11</b> - Recálculo dos dados apresentados na Figura 2 (A e B) e na Figura 4 (C) de Takeushi <i>et al</i> (1999).....	41



## Siglas e Abreviaturas

ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EC	Enzyme Commission
EPA	Environmental Protection Agency
EtilHg	Etilmercúrio
Hg	Mercúrio
MerA	Mercurio Redutase
MetilHg	Metilmercúrio
MIC	Concentração Inibitória Mínima, do inglês Minimal Inhibitory Concentration
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
PCR	Reação da polimerase em cadeia, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
TpDos	Tampão de dosagem
Tplise	Tampão de lise

# SUMÁRIO

Catologação na fonte .....	ii
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica .....	ii
Biblioteca de Saúde Pública.....	ii
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>A historia do mercúrio</i> .....	1
1.2 <i>O elemento mercúrio</i> .....	1
1.3 <i>Acidentes com mercúrio</i> .....	2
1.4 <i>Toxicidade do Mercúrio</i> .....	4
1.5 <i>Resistencia Bacteriana ao Mercúrio</i> .....	5
1.6 <i>Justificativa</i> .....	7
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>8</b>
2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	8
2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	8
<b>3 Material e Métodos .....</b>	<b>9</b>
3.1 <i>Reagentes, meios de cultura e outros materiais</i> .....	9
3.2 <i>Amostras bacterianas</i> .....	9
3.2.1 <i>Coleta de amostras de água</i> .....	9
3.2.2 <i>Isolamento e estocagem de bactérias</i> .....	9
3.2.3 <i>Escolha das amostras</i> .....	10
3.3 <i>Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de mercúrio</i> .....	10
3.4 <i>Identificação das bactérias isoladas</i> .....	11
3.5 <i>Determinação da sensibilidade a antibióticos</i> .....	11
3.6 <i>Determinação do teor de proteínas totais</i> .....	12
3.7 <i>Determinação do número de células viáveis</i> .....	12
3.8 <i>Curva de crescimento e determinação do tempo de geração</i> .....	13
3.9 <i>Desafio com mercúrio para células em fase exponencial de crescimento</i> .....	14
3.10 <i>Determinação da atividade da enzima mercúrio redutase (MerA)</i> .....	14
3.10.1 <i>Obtenção de biomassa bacteriana</i> .....	14
3.10.2 <i>Obtenção da fração solúvel livre de células</i> .....	15
3.10.3 <i>Determinação da atividade da enzima</i> .....	16
3.11 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para determinação do genótipo da enzima mercúrio redutase</i> .....	17
3.12 <i>Análises estatísticas</i> .....	18
3.13 <i>Revisão da literatura</i> .....	18

<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>19</b>
4.1	<i>Coleta de amostras de água e isolamento de bactérias.....</i>	<i>19</i>
4.2	<i>Caracterização de amostras bacterianas com fenótipo de resistência ao mercúrio e taxonomia de bactéria selecionadas .....</i>	<i>20</i>
4.3	<i>Desafio de células em fase exponencial de crescimento com mercúrio .....</i>	<i>22</i>
4.4	<i>Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para determinação do genótipo da enzima mercúrio redutase.....</i>	<i>24</i>
4.5	<i>Determinação da enzima mercúrio redutase .....</i>	<i>24</i>
4.5.1	<i>Escolha das amostras .....</i>	<i>24</i>
4.5.2	<i>Produção de biomassa .....</i>	<i>25</i>
4.5.3	<i>Produção de fração solúvel.....</i>	<i>25</i>
4.5.4	<i>Reação enzimática e quantificação da enzima .....</i>	<i>28</i>
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>44</b>

## **1 Introdução**

### **1.1 A história do mercúrio**

O nome dado ao elemento químico é uma referência ao deus romano Mercúrio, o mensageiro dos deuses. Também estava associado ao lucro e ao comércio, seu nome vem do latim *Merx*, mercadoria. Acredita-se que foi Aristóteles quem denominou o elemento mercúrio, 400 A.C., de *Hydrargyrum*, que quer dizer "água prateada" (Azevedo, 2003).

Os Romanos herdaram parte do conhecimento grego sobre o mercúrio e expandiram as aplicações comerciais. A extração de ouro utilizando mercúrio para formar amalgama já era uma prática conhecida pelos romanos. A aplicação medicinal incluía drogas mercuriais para curar doenças da pele, dos olhos, a sífilis e a cura de queimaduras (Miranda *et al.*, 2007). O uso do mercúrio foi inicialmente associado com práticas religiosas e místicas e depois teve uso em práticas medicinais, farmacêuticas e industriais.

Nos séculos XVII e XVIII, época em que se priorizava o acúmulo de riquezas, principalmente de metais, o mercúrio era usado para extrair prata. Foi utilizado na confecção de instrumentos, tais como: o barômetro de Torricelli em 1643, o termômetro de mercúrio desenvolvido por Fahrenheit em 1720 e outros instrumentos de medição. Uma descoberta importante foi a introdução de células eletrolíticas à base de mercúrio na indústria de cloro-soda em 1894 por Castner e o desenvolvimento de baterias de mercúrio durante a Segunda Guerra Mundial. No século XVIII, a mina de Almadén, na Espanha, era amplamente explorada por escravos para a extração de mercúrio (Nriagu, 1979; Azevedo, 2003).

Hoje, o metilmercúrio (metilHg) acumulado nos peixes, o vapor de mercúrio liberado no ambiente, o mercúrio utilizado em amalgamas de obturações dentárias e o thimerosal em vacinas são as formas em que este metal está mais presente em nossa época.

### **1.2 O elemento mercúrio**

O mercúrio ocorre naturalmente no ambiente podendo ser classificado em três grupos: mercúrio metálico, mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico. Mercúrio metálico também conhecido como mercúrio elementar é um metal líquido e prateado a temperatura ambiente, é utilizado em termômetros e

---

interruptores elétricos. As formas inorgânicas ocorrem quando este se combina principalmente com enxofre, cloro ou oxigênio constituindo-se em sais de mercúrio. Geralmente são pós brancos, ou cristais, mas quando combinado ao enxofre forma o cinábrio (sulfeto de mercúrio) que é vermelho e após exposição à luz fica preto. Quando o mercúrio se combina ao carbono forma os compostos orgânicos ou organomercuriais, no meio ambiente o composto mais comum é o metilmercúrio (metilHg) (Azevedo, 2003).

O ciclo biogeoquímico do mercúrio é muito complexo por envolver a inter-relação entre os sistemas aquáticos, atmosféricos e terrestres. A especiação do mercúrio em ambientes aquáticos é influenciada pela relação do mercúrio com a biota e complexos orgânicos e inorgânicos da coluna d'água e dos sedimentos (Miranda *et al.*, 2007). Os ecossistemas aquáticos encontram-se saturados de mercúrio elementar aquoso, ocorrendo um fluxo contínuo de mercúrio elementar para a atmosfera podendo variar a intensidade de acordo com fatores ambientais como concentração de carbono dissolvido e radiação solar (Morel *et al.*, 1998).

O vapor de mercúrio elementar encontrado na atmosfera sofre reações de oxidação, provavelmente o ozônio é o oxidante mais importante (Morel *et al.*, 1998). É depositado no solo ou na água através das chuvas ou neve e assim pode ser novamente reduzido (Barkay *et al.*, 2003).

### **1.3 Acidentes com mercúrio**

Em 1860, em Londres, foi sintetizado o primeiro composto orgânico de mercúrio, o metilHg. Dois dos técnicos de laboratório que trabalhavam no local morreram por exposição a este elemento. As aplicações industriais e comerciais com mercúrio foram pouco desenvolvidas neste período, até o final deste século. No início do século XX retomou-se os estudos com o mercúrio e algumas de suas propriedades foram consagradas, como o seu uso em grãos de cereais atuando como fungicida (Clarkson, 2002).

Os mais graves acidentes com mercúrio ocorreram nas décadas de 1950 e 1960 nas Baías de Minamata e Nigata no Japão e em 1970 no Iraque. Esses acidentes tiveram repercussão mundial.

No início de 1950, no entorno da região da Baía de Minamata, Japão, foram observados fenômenos sem motivo aparente: pássaros caíam no momento de pleno

---

vão e morriam; peixes girando e flutuando, de barriga para cima, próximos à superfície e peixes mortos boiando nas águas. Em seguida os gatos foram afetados: não conseguiam andar em linha reta, pulavam na baía e se afogavam, faziam violentos movimentos de rotação e caíam mortos (Harada, 1995). Uma das maiores indústrias do Japão, que produzia fertilizantes químicos, resinas sintéticas, plásticos e outros compostos químicos, tinha o metilHg como um subproduto da produção de acetaldeído. O resíduo industrial era todo lançado nas águas da baía e a população consumia os peixes e crustáceos contaminados. Os níveis de mercúrio nos peixes e frutos do mar estavam elevados: 35,7 mg/kg nos caranguejos; 5,61 mg/kg nas ostras, quando não deve exceder 0,5 mg/kg de mercúrio total em um consumo semanal de 400 gramas (Bisinoti e Jardim, 2004).

No final de 1953, a doença afetava adultos e crianças. Ficou reconhecido oficialmente que 2.252 pessoas foram diretamente expostas e contaminadas, sendo reconhecidas 1.043 mortes em um total de 12.127 pessoas que alegavam ter a doença. As pessoas apresentavam sintomas neurológicos tais como: tremores musculares, desequilíbrio ao andar, visão turva, redução do campo visual, perda de audição, dificuldade na articulação das palavras e, nos casos mais graves, paralisia e morte. Esta doença mais tarde ficou conhecida como “Mal de Minamata” ou “Doença de Minamata” (Harada, 1995; Bisinoti e Jardim, 2004). Com o tempo foi observado um elevado número de nascimentos de crianças com mau desenvolvimento cerebral ou paralisia. As que sobreviviam após o nascimento tinham problemas neurológicos, semelhantes aos dos adultos. Estes distúrbios foram atribuídos à exposição materna durante a etapa gestacional (Eto, 1997; Ekino *et al.*, 2007).

No Iraque, na década de 1970, ocorreram casos de contaminação com metilHg e etilHg. Os agricultores e seus familiares produziram pães caseiros com os grãos tratados com fungicidas mercuriais, cerca de 6.900 pessoas foram hospitalizadas e pelo menos 459 morreram. Calcula-se que mais de 40.000 pessoas tenham sido expostas. No caso do Iraque em particular houve uma associação de fatores que proporcionaram este desastre. Os rótulos dos fungicidas não foram traduzidos para a linguagem local, os símbolos de identificação de perigo no rótulo do produto não eram conhecidos na área rural do Iraque e os agricultores achavam que apenas lavando os grãos teriam retirado todo o fungicida que foi aplicado (Unep, 2002; Bisinoti e Jardim, 2004).

---

Na Suécia, também em torno da década de 1950, foi relatado um grande desastre ambiental relacionado com mercúrio. Alguns pássaros predadores, que estavam no topo de uma cadeia alimentar, estavam desenvolvendo desordens neurológicas. Os pássaros se alimentavam de pequenos mamíferos roedores que consumiam grãos nos campos de plantações de cereais, esses grãos eram tratados com fungicidas mercuriais. Analisando as penas das aves foi possível verificar que os níveis de Hg nas penas se tornavam extremamente elevados quando estas estavam em território Sueco. Para estabelecer uma comparação os pesquisadores decidiram examinar penas de aves que se alimentavam somente de peixes, onde os níveis de mercúrio eram considerados baixos. A surpresa foi que, também foi observado um alto nível de contaminação por mercúrio, apesar destas aves não terem nenhuma conexão com os grãos tratados com fungicidas mercuriais. Então se observou que os peixes estavam contaminados com metilHg. Esta foi uma descoberta histórica, os micro-organismos no ambiente aquático são capazes de converter mercúrio inorgânico em metilHg, este é o primeiro passo da cadeia alimentar onde o mercúrio vai bioacumulando nos níveis tróficos superiores até chegar aos peixes de topo de cadeia que servem de alimento para o homem (Clarkson, 2002).

#### **1.4 Toxicidade do Mercúrio**

O mercúrio é, dentre os metais contaminantes, aquele que apresenta a maior toxicidade, podendo ser bioacumulado de fontes bióticas, como outros organismos ou de fontes abióticas, como a água. Além de ser um metal capaz de sofrer biomagnificação, isto é, sua concentração aumenta em sucessíveis níveis tróficos. Este aspecto é o mais significativo impacto a saúde de animais e humanos. (Unep, 2002; Lacerda e Malm, 2008).

A principal via de exposição do homem ao metilHg, é através da ingestão de alimentos contaminados, principalmente animais aquáticos (ex. peixe, mariscos, mexilhões, etc. ). Em peixes adultos entre 90 e 100% do mercúrio está na forma de metilHg (EPA 2001). Este é o único metal que reconhecidamente causou óbitos em humanos através da contaminação ambiental, particularmente via ingestão de organismos aquáticos contaminados (Barkay *et al.*, 2003; Dorea *et al.*, 2003; Lacerda e Malm, 2008).

---

Quando há exposição aguda a mercúrio inorgânico podem ocorrer danos aos pulmões. O envenenamento crônico apresenta sintomas como tremores, alteração de personalidade, inquietação, ansiedade, distúrbios do sono e depressão. Os sintomas tendem a desaparecer após um período de não exposição. O mercúrio metálico, caso ingerido, pode afetar os rins. (Jarup, *et al.*, 2003 e Miranda *et al.*, 2007).

O metilHg é a forma mais tóxica de mercúrio, causa alterações neurológicas, tais como, baixa coordenação para andar, perda de audição, dificuldade na articulação das palavras, deterioração mental entre outros. Em adultos é caracterizado por um período de latência entre a exposição e o surgimento dos sintomas, podendo variar de semanas a meses dependendo da dose e do período de exposição (Clarkson, 2002; Bisinoti e Jardim, 2004).

Uma vez lançado no ambiente o mercúrio oscilará entre as suas varias formas químicas, mas permanecerá no ambiente. Os sedimentos de rios e oceanos poluídos são potencialmente perigosos porque o mercúrio pode permanecer como substrato para metilação por cerca de 100 anos (Bisinoti e Jardim, 2004).

### **1.5 Resistencia Bacteriana ao Mercúrio**

Os estudos sobre a ocorrência de mecanismos de tolerância ao mercurio começaram no final da década de cinquenta e início de sessenta. O primeiro relato de resistência bacteriana ao mercurio foi de um isolado clínico de *Staphylococcus aureus* que demonstrou resistência a compostos orgânicos e inorgânicos de mercúrio e também resistência ao antibiótico penicilina (Moore, 1960). A resistência a antibióticos e ao metal mercúrio era conferida por um mesmo elemento genético móvel chamado de plasmídeo (Richmond e John, 1964; Novick e Roth, 1968). Quase ao mesmo tempo, estudos diziam que bactérias ambientais, como *Pseudomonas* poderiam transformar organomercuriais em mercúrio volátil (Tonomura *et al.*, 1968; Suzuki *et al.*, 1968; Furukawa *et al.*, 1972). Ficou então reconhecido que alguns gêneros bacterianos poderiam resistir a presença do mercúrio e outros seriam capazes de volatilizar o mercúrio (Schottel *et al.*, 1978).

A resistência a mercúrio e a antibióticos é possível de ser encontrada na natureza e em condições experimentais. A resistência a antibióticos é uma das formas mais comum de adaptação bacteriana. Estudos de resistência ao mercúrio em *Pseudomonas* e na família *Enterobacteriaceae* sugerem que exista alguma

---



ligação genética entre resistência a mercúrio e a resistência a alguns antibióticos como ampicilina e estreptomicina (Summers *et al*, 1993). Pesquisas realizadas com bactérias resistentes ao mercúrio sugerem que a pressão seletiva ambiental e a transferência horizontal de genes, comum entre as bactérias, desempenharam um papel fundamental na distribuição da resistência ao mercúrio e a antibióticos (Zeyauallah *et al*, 2007; Zeyauallah *et al*, 2010).

Com a evolução ao longo do tempo e o enriquecimento deste metal nos ambientes, os organismos foram adquirindo diversidades nos mecanismos de tolerância ao mercúrio seja para volatilizar ou aprisionar (De *et al*, 2008). Com a constante exposição a compostos mercuriais as comunidades bacterianas desenvolveram vários tipos de mecanismos de resistência para permitir que elas sobrevivessem aos efeitos tóxicos do mercúrio.

São cinco os mecanismos de resistência ou detoxificação bacteriana conhecidos para o mercúrio: (1) bloqueio, em que o íon tóxico é impedido de entrar na célula ou sua captação é reduzida; (2) transporte ativo (bombas de efluxo) do íon metálico, por células com sistema altamente específico, codificados por genes de resistência; (3) seqüestro intracelular não específico do metal, por proteínas de ligação; (4) o seqüestro extracelular, muitas vezes por polissacarídeos extracelulares na parede celular e (5) conversão enzimática do metal para formas menos tóxicas ou voláteis (Osborn *et al*, 1997, Mathema *et al*, 2011).

Este último mecanismo é mediado pela presença do operon *mer* e do gene *merA*, encontrados em transposons (ex. Tn501, Tn5041, Tn5056 e Tn21) e em plasmídios (ex. pKLH2, pDU1258, pMERPH) (Osborn *et al*, 1997 e Mindlin *et al*, 2005). A redução enzimática do  $Hg^{2+}$  em  $Hg^0$  é o mecanismo de resistência mais bem estudado. A redução ocorre em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, de origem ambiental ou clínica. Este mecanismo de resistência envolve o operon *mer* que consiste em um grupo de genes, dentre eles *merR*, um gene regulador, que funciona como um repressor ou ativador de todo o mecanismo, estabelecendo condições para uma resposta instantânea à presença de mercúrio no citosol (Barkay *et al*, 2003).

A retirada do  $Hg^{2+}$  do meio externo a célula, ocorre através da sua ligação a um par de cisteínas presentes na proteína MerP do periplasma ( espaço entre as membranas interna e externa de uma célula bacteriana). O  $Hg^{2+}$  é transferido da

---

proteína MerP para o par de cisteínas da proteína MerT . A transferência de íons se dá por reação redox. O  $\text{Hg}^{2+}$  é transportado para a face do citoplasma da proteína MerT sendo transferido para o domínio aminoterminal da enzima mercúrio redutase (MerA) . O  $\text{Hg}^{2+}$  associado às cisteínas desta enzima é reduzido a  $\text{Hg}^0$  em uma reação NADPH dependente, que funciona como doador de elétrons (Osborn *et al*, 1997, Mathema *et al*, 2011).

A enzima mercúrio redutase (MerA), foi depositada no Banco de Nomenclaturas enzimáticas por Fox e Walsh (1982) e recebeu o registro de EC 1.16.1.1, pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), catalisando a seguinte reação:



A MerA contém FAD, utiliza NADPH como doador de elétrons e requer um excesso de radicais tiol, que irão complexar o  $\text{Hg(II)}$ . A maneira pela qual a célula gasta menos energia para se livrar de um metal possivelmente tóxico e este sendo volátil é reduzi-lo a um gás (Barkay *et al*, 2003), o  $\text{Hg}^0$  formado, menos tóxico, tende a se volatilizar, sendo liberado no citoplasma e saindo da célula por difusão passiva.

## 1.6 Justificativa

Os poucos dados existentes na literatura, cerca de 400 trabalhos, envolvendo a enzima MerA, especialmente quando da seleção de bactérias visando a biorremediação de mercúrio, não consolidou uma metodologia única para a determinação quantitativa desta enzima em biomassas bacterianas como critério de seleção.

Desta forma, na busca de um organismo em amostras coletadas em território brasileiro, mostrou-se necessária a revisão dos métodos de quantificação e normalização da atividade desta enzima. Além disso, a falta desta padronização implica em ter que rever e estabelecer condições de cultivo e de estocagem das culturas.

O isolamento de bactérias tolerantes ao mercúrio no território brasileiro, quantificando a atividade de MerA, permite avaliar a participação deste mecanismo no ciclo biogeoquímico do mercúrio.

---

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Isolar bactérias tolerantes ao mercúrio de ecossistemas aquáticos brasileiros e investigar se esta tolerância é mediada pela atividade da enzima mercúrio redutase.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Isolar bactérias que apresentem tolerância ao mercúrio de amostras de água coletadas em diferentes ecossistemas brasileiros;
  2. Identificar as amostras mais tolerantes ao mercúrio por coloração de Gram e provas bioquímicas;
  3. Avaliar a sensibilidade a antimicrobianos dos isolados com maior tolerância ao mercúrio;
  4. Investigar a relação entre a tolerância ao mercúrio e a presença do gene *merA* com os níveis de MerA em bactérias selecionadas.
-

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Reagentes, meios de cultura e outros materiais**

Caldo LB: Luria Broth, Miller (Sigma código 3152); Agar LB: Luria Agar, Miller (Sigma código 3272) Caldo Nutriente: Nutrient Broth (Difco código 234000); Agar Nutriente: Nutrient Agar (Difco código 213000); Solução de Hg(II): Solução Padrão de mercúrio a 1000ppm (Fluka código 16482); NADPH: B-Nicotinamida Adenina Dinucleotideo 2-Fosfato Reduzido (Sigma código N1630); DTT: DL-ditiotreitól (Sigma código D0632); PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonila (Sigma código P7626); Agar Estoque: 0,8g de cloreto de sódio, 1,0g de caldo nutriente, 0,6g de bacto agar, 100mL de água destilada, pH 7,2 - 7,4; Todos os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

#### **3.2 Amostras bacterianas**

##### **3.2.1 Coleta de amostras de água**

Foram coletadas amostras de água utilizando seringas de 60mL (marca BD) acopladas a um suporte de filtração (Millipore) contendo uma membrana de acetato de celulose, com porosidade de 0,22 $\mu$ m e 47mm de diâmetro conforme Vasconcellos, (2010) na qual as bactérias ficam retidas. O suporte contendo a membrana foi mantido sob refrigeração até o seu retorno ao laboratório para o processamento. Todo o material utilizado foi esterilizado antes do uso. O número de amostras de água coletadas por estado brasileiro variou de acordo com a disponibilidade de recurso para coletas de campo, parceria com colaboradores e cronograma para recebimento de amostras no laboratório. A coleta de amostras de água teve início nos projetos CNPq Universal de 2007 (482901/2007-1) e FIOCRUZ-PAPES V de 2008 (403617/2008-1), nos quais esta dissertação está inserida.

##### **3.2.2 Isolamento e estocagem de bactérias**

No laboratório, os suportes de filtração foram abertos em ambiente estéril e as membranas foram transferidas com auxílio de uma pinça estéril para tubos tipo Falcon de 50 mL estéreis, contendo meio de cultura Caldo Nutriente e 5 $\mu$ M de Hg(II) a partir da Solução Padrão. Após 24/48 horas de incubação a 37°C, as culturas obtidas foram semeadas por esgotamento em placas de Petri contendo Agar Nutriente acrescido de 5 $\mu$ M de Hg(II). As placas foram incubadas nas mesmas

---

condições descritas anteriormente. Foram selecionadas de 3 a 5 colônias morfológicamente distintas a olho nu, mantendo a proporcionalidade das colônias na placa. Cada colônia foi transferida para caldo nutriente adicionando-se glicerol depois do crescimento até a concentração final de 20% v/v. Estas culturas foram estocadas à -20°C até o momento de seu uso.

### 3.2.3 Escolha das amostras

As amostras a serem trabalhadas nas etapas de investigação das relações entre a tolerância ao mercúrio, a presença do gene *merA* e os níveis da enzima MerA foram: o micro-organismo isolado que apresentou a maior tolerância ao mercúrio e sensibilidade aos principais antibióticos; a cepa de *Escherichia coli* ATCC 23724, conhecida na literatura como sensível; e a cepa de *E. coli* ATCC 35218, descrita como resistente ao mercúrio.

### 3.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de mercúrio

**MIC<sup>1</sup>** - As colônias bacterianas isoladas foram cultivadas em placas de Petri com Agar Nutriente, contendo concentrações crescentes de Hg(II) para determinar a concentração mínima de mercúrio capaz de inibir o crescimento bacteriano de cada cepa (MIC). As colônias foram cultivadas em 5mL de Caldo Nutriente, incubadas em estufa a 37°C até que a densidade de células bacterianas fosse comparável a 0,5 da escala de McFarland, equivalente a 0,08 unidades de Absorvância no comprimento de onda de 600 nanômetros, medido contra o meio de cultura. Esta suspensão, contendo aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL, foi inoculada na forma de duplo *spot*, em cada placa de Agar Nutriente, com duplicata de placa para cada concentração (5, 10, 20, 30, 40 e 45µM Hg(II)). O *spot* foi realizado com auxílio de uma micropipeta contendo o volume de 2µL (Andrews, 2001) e as placas foram incubadas a 37°C de 24 a 48 horas. Cada experimento de MIC teve como controle uma placa de Agar Nutriente sem adição de mercúrio, para testar a viabilidade da cepa em crescer no meio de cultura testado. Após este tempo (incubação) foram feitas as leituras dos resultados: ausência ou presença de crescimento visível com auxílio de uma lupa bacteriológica.

**MIC<sup>2</sup>** - Segue todo o procedimento descrito acima com a alteração do meio de cultura, sendo utilizado o caldo LB e as placas preparadas com Agar LB.

### 3.4 Identificação das bactérias isoladas

Todas as 143 amostras do estudo foram submetidas à coloração de Gram e à determinação da MIC<sup>1</sup>. As amostras que apresentaram MIC<sup>1</sup> igual ou superior a 20µM de Hg(II) foram selecionadas para identificação do perfil bioquímico empregando kits comerciais: API® 20E (Biomerieux) com 20 provas bioquímicas, Enteric/Nonfermenter ID (BD BBL Crystal) com 20 provas bioquímicas e Rapid Gram Positive ID (BD BBL Crystal) com 20 provas bioquímicas. Segundo recomendações do fabricante: três a quatro colônias foram suspensas em um tubo contendo líquido de inóculo, o tubo foi agitado 10 a 15 segundos e o líquido vertido na base do kit. O kit foi incubado a 37°C por 18-24 horas e após este período foi feita a leitura das provas bioquímicas. Os testes baseiam-se em provas bioquímicas miniaturizadas, que incluem testes para a fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos. As leituras foram feitas pela alteração de cor em consequência da atividade metabólica do micro-organismo, o resultado foi convertido em números e lançado em um programa de computador para interpretação dos dados e efetivar a identificação.

### 3.5 Determinação da sensibilidade a antibióticos.

Foram selecionadas para a determinação da sensibilidade a antibióticos as amostras que apresentaram MIC<sup>1</sup> para mercúrio igual ou superior a 30µM, e que foram classificadas como Gram-negativa, foram testadas pela técnica de difusão por discos com o método de Kiber-Bauer (CLSI, 2008). Que, de forma resumida, ocorre da seguinte maneira: as amostras bacterianas previamente estocadas foram cultivadas em Caldo Mueller-Hinton (Oxoid/Inglaterra) até que a densidade de células bacterianas fosse comparável a 0,5 da escala de McFarland, equivalente a 0,08 de Absorvância no comprimento de onda de 600 nanômetros medido contra o meio de cultura. Utilizando *Swabs* estéreis, o inóculo foi semeado homogeneamente em toda a superfície das placas contendo Agar Mueller-Hinton (Oxoid/Inglaterra). Após alguns segundos, os discos contendo antibióticos (Oxoid/Inglaterra) Cloranfenicol (30µg), Tetraciclina (30µg), Estreptomicina (300µg), Ácido Nalidixico (30µg), Gentamicina (10µg), Sulfametoxanol-Trimetropim (25µg), Canamicina (30µg) e Ampicilina (10µg), foram dispensados simultaneamente com auxílio de um dispensador de discos (Oxoid/Inglaterra) na superfície das placas já semeadas seguindo incubação em estufa a 37°C por 18

horas. Após este período, foi feita a leitura e a interpretação dos halos. Os critérios para definição das bactérias como Resistente, Intermediário ou Sensível aos antibióticos testados foram baseados nos respectivos diâmetros das zonas de inibição de crescimento em milímetros.

### **3.6 Determinação do teor de proteínas totais**

O teor de proteínas totais, em todos os ensaios citados, foi determinado por uma modificação do método de Lowry, conforme proposto por Peterson (1977). Este procedimento consiste, resumidamente, em: alíquotas da amostra foram transferidas para tubos de ensaio e avolumadas para 0,5mL com água destilada, seguindo-se a adição de 1mL de reagente de dosagem A. Este reagente foi preparado adicionando-se uma solução de carbonato de sódio a 20%, lentamente, a uma solução de sulfato-tartarato de cobre até as concentrações finais de sulfato de cobre de 0,1%, de tartarato de potássio de 0,2% e de carbonato de sódio de 10%. Depois de homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, foram adicionados 0,5mL de reagente de dosagem B (Reativo de Folin-Ciaucalteu (Merck) 2N diluído 1:5). Durante a adição deste reagente, os tubos foram vigorosamente agitados e em seguida incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Para a curva de controle foram utilizados 2 concentrações conhecidas de proteína (Soro Albumina Bovina SIGMA), tubo P10 contendo 10 $\mu$ g e o tubo P100 contendo 100 $\mu$ g de proteína para um volume final de 2,5mL. No tubo "branco" foi adicionada água destilada no lugar de amostra. A leitura foi feita em um espectrofotômetro UV-Visível a 750 nanômetros. No reagente A não foi adicionado o detergente, por provocar a formação de precipitado, sendo esta etapa opcional, conforme descrito por Peterson (1977).

### **3.7 Determinação do número de células viáveis**

Alíquotas de 0,1mL da suspensão bacteriana foram diluídas em 0,9mL de salina estéril e sequencialmente diluídas em escala de 10 vezes até pelo menos 10<sup>-10</sup>. De cada uma das quatro últimas diluições foram retiradas alíquotas de 0,1mL para semear homogeneamente placas de meio Agar LB, com auxílio de alça de Drigalsk. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C e depois deste período as colônias foram quantificadas.

---

### 3.8 Curva de crescimento e determinação do tempo de geração

Cada bactéria foi semeada a partir do estoque em Agar LB, com ou sem a adição de Hg(II) e incubada em estufa bacteriológica a 37°C para obtenção de colônias isoladas e verificação da pureza do estoque. Após este procedimento, 3 a 5 colônias foram selecionadas e repicadas para tubos de ensaio contendo 4mL de Caldo LB, com ou sem a adição de Hg(II). Estes tubos foram incubados a 37°C por aproximadamente 16 horas para obtenção da cultura fisiologicamente ativa. Estes tubos foram usados como inóculo para outros 25mL do mesmo meio em frascos de Erlenmeyer, incubados da mesma forma sem agitação. Estas culturas, de no máximo 16 horas, foram usadas como inóculo para 100mL do mesmo meio e cultivadas sob agitação, em agitador orbital a 120rpm e 37°C para determinação da curva de crescimento. Durante este crescimento, amostras foram retiradas em condições assépticas e usadas para a determinação da turvação por leitura da Absorvância a 600nm tendo Caldo LB como referência. Os resultados foram usados para a construção de gráficos relacionando o crescimento celular em função do tempo. Uma Regressão Linear entre o logaritmo natural da turvação e o tempo permitiu calcular a Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) de acordo com a equação:

$$dN/dt = \mu \cdot N \quad [1]$$

Integrando esta equação entre dois tempos da curva de crescimento dentro da fase exponencial de crescimento celular temos:

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu(t - t_0), \quad [2] \text{ ou:}$$

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0)/(t - t_0) \quad [3]$$

O Tempo de Geração (TG) da bactéria pode ser calculado pela equação:

$$TG = \ln 2/\mu \quad [4]$$

O valor  $N$ , sendo  $N_0$  o inóculo, em verdade o número de células, pode ser substituído por qualquer medida que tenha uma correlação direta com o número de células. Neste trabalho, empregamos a leitura fotométrica da turvação gerada pelas células em um espectrofotômetro ajustado para 600 nanômetros e zerado com o próprio meio de cultura. A equação [2] descreve uma reta em um gráfico de  $\ln A_{600}$  contra o tempo em minutos, sendo  $t_0$  o momento inicial,  $t$  o momento da coleta da amostra e  $N_t$  a quantidade de células depois da variação de tempo, cuja inclinação representa  $\mu$ , ou a Velocidade Específica de Crescimento Celular, que foi determinada em planilhas eletrônicas por Regressão Linear ajustada pelos Quadrados Mínimos, com  $r^2$  de pelo menos 0,95.



### **3.9 Desafio com mercúrio para células em fase exponencial de crescimento**

Inóculos preparados como descrito no item 3.8, sem a adição de mercúrio nos meios de cultura, foram usados para semear 100mL de Caldo LB em frascos de Erlenmeyer de 500mL de modo a obter leituras iniciais de turvação a 600nm ao redor de 0,05 unidades de Absorvância. Os frascos foram incubados a 37°C sob agitação de 120rpm em agitador orbital de chão tendo sido avaliada a curva de crescimento celular até cerca de 0,5 unidades de Absorvância em amostras de 2mL retiradas a cada 30 minutos. As leituras foram feitas diretamente sempre usado como referencia um frasco da mesma marca e modelo contendo somente caldo LB estéril. Neste momento, uma solução de mercúrio em Caldo LB, preparada no momento do uso a partir da Solução Padrão de Mercúrio, foi adicionada ao crescimento bacteriano, para atingir concentrações finais entre 5 e 30 $\mu$ M de Hg(II), e o crescimento celular foi acompanhado por pelo menos mais 3 horas, da mesma forma descrita anteriormente.

### **3.10 Determinação da atividade da enzima mercúrio redutase (MerA)**

#### ***3.10.1 Obtenção de biomassa bacteriana***

De modo a garantir uma melhor comparação entre as amostras testadas, a biomassa para a determinação de MerA foi produzida em condições iguais de crescimento e na ausência de mercúrio. Cada bactéria foi semeada a partir do estoque e incubada em estufa bacteriológica a 37°C para obtenção de colônias isoladas e verificação da pureza do estoque. Após este procedimento, 3 a 5 colônias foram selecionadas e repicadas para tubos de ensaio contendo 4mL de Caldo LB. Estes tubos foram incubados a 37°C por aproximadamente 16 horas para obtenção da cultura fisiologicamente ativa. As soluções bacterianas contidas nestes tubos foram usadas como inóculo para outros 25mL do mesmo meio em frascos de Erlenmeyer, incubados da mesma forma sem agitação. Estas culturas de no máximo 16 horas. Após este período, os tubos de ensaio contendo o pré-inóculo foram usados como inóculo para 100mL (Ramanan *et al*, 2008) de Caldo LB e de Caldo LB contendo 5 $\mu$ M de Hg(II) em frascos de Erlenmeyer de 500mL. Depois do inóculo, uma alíquota de 2mL foi retirada em condições estéreis, para a determinação da Absorvância inicial a 600nm ( $A_{600}$ ) contra o meio de cultura. Os frascos foram incubados a 37°C em agitador rotativo de chão a 120rpm com retirada de amostras a cada hora para a determinação da  $A_{600}$ . Os resultados foram

---

usados para a construção de regressões lineares para a determinação do tempo de geração. As células da fase exponencial de crescimento foram conservadas no próprio meio a 5°C por, no máximo, 16 horas antes da recuperação da biomassa.

### **3.10.2 Obtenção da fração solúvel livre de células**

A obtenção da fração solúvel ocorre em seis etapas:

(1) Recuperação da biomassa celular: As células foram recuperadas por centrifugação a 5000g, por um período de 10 minutos com temperatura controlada de 5°C.

(2) Lavagem da biomassa: A biomassa celular foi lavada 3 vezes com salina e intensa agitação a 3500rpm aproximadamente (Vortex) e ressuspensas em tampão de lise gelado, (TpLise; tampão fosfato pH 7,2 20mM contendo 1mM de PMSF, Ogunseitan, 1998 modificado).

(3) Ajuste de Densidade Óptica (DO): A biomassa foi suspensa, em aproximadamente 10mL de Tplise até chegar à DO de 5,0 A<sub>600</sub> e conservada a 5°C por no máximo 16 horas. Uma alíquota de 6mL desta suspensão foi transferida para tubo Falcon de 15mL. Seis gramas de pérolas de vidro (Sigma 425-600 micrometros) foram adicionadas.

(4) Diluição seriada: Após homogeneizar a suspensão bacteriana com as pérolas de vidro por 5 segundos de agitação, foram tomadas alíquotas de 0,1mL para determinação do número de células viáveis. Conforme item 3.7.

(5) Processo de lise celular: Dez ciclos de 20 segundos (200 segundos de tratamento), em Vortex intercalados com a imersão em banho de gelo por um minuto, foram testados para tentar garantir a lise das células. Depois dos tratamentos, todo o material restante no tubo Falcon de 15mL foi centrifugado a 5000g por 10min em temperatura controlada de 5°C e o sobrenadante foi coletado e conservado a -20°C por no máximo 16 horas, para a determinação de MerA.

(6) Dosagem de proteína total: Uma alíquota de 0,2mL foi retirada no início de cada ciclo (dez de 20 segundos, na etapa anterior) e centrifugada a 14000rpm em centrifuga de Eppendorf por 5 minutos, para a determinação do teor de proteínas totais nos sobrenadantes durante o processo de lise celular bacteriana.

---

### 3.10.3 Determinação da atividade da enzima

No momento da determinação de MerA, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 35.000g por 30 minutos em temperatura controlada de 5°C e o sobrenadante foi coletado e mantido em banho de gelo. A determinação da atividade de MerA foi feita tendo como apoio o protocolo de Takeushi, 1999, baseado na medida do consumo de NADPH na presença de Hg(II). O tampão de dosagem (TpDos) continha (concentração final): 50,0mM de Fosfatos (Na/K) pH 7,2; 0,2mM de NADPH; 1mM de DTT; 0,2mM de MgSO<sub>4</sub>; e 0,5mM de EDTA. Este tampão deve ser preparado no momento do uso aferindo a concentração final de NADPH pela Absorvância a 340nm, que deverá ser 1,586 para o TpDos (0,255mM), garantindo 0,2mM de concentração final de NADPH. Como fonte de Hg(II) foi usada uma Solução Padrão comercial de Hg(II) a 1000mg/L (4,987mM), garantindo 0,097mM final de Hg(II).

O procedimento de dosagem seguiu o seguinte protocolo:

**Amostra** 100μL

**TpDos** 400μL

1 - Agitar com ponteira e transferir 400μL para a cubeta;

2 - Colocar no espectro zerado com água e acompanhar as leituras de Absorvância a 340nm a cada minuto por 20min. Estas leituras foram usadas para a construção de uma regressão linear e a inclinação ( $dA_{340nm}/min$ ) foi usada para a quantificação da enzima (MerA controle).

**Amostra + TpDos** 400μL

**Hg(II)** 8μL

3 - Adicionar o mercúrio diretamente na cubeta, agitar com ponteira e disparar nova corrida de 20min com leituras a cada minuto. Estas leituras foram usadas para a construção de uma segunda Regressão Linear e a inclinação ( $dA_{340nm}/min$ ) foi usada para a quantificação da enzima (MerA total).

A medida é cinética e deverá incluir a parte mais linear das duas regressões, escolhidas pelo maior Coeficiente da Determinação ( $r^2$ ). Nos primeiros minutos depois da adição do Hg(II) ocorre um grande declínio da  $A_{340nm}$ , que depois se estabiliza como uma queda linear. Nestas condições, uma Unidade de enzima (U) é a quantidade de proteína que consegue consumir 1μmol de NADPH por minuto.

Os cálculos para a determinação de atividade foram, considerando a Absortividade do NADPH a 340nm como  $6.220.M^{-1}.cm^{-1}$ :

$$dA_{340nm} = \text{MerA total} - \text{MerA controle} \quad [5]$$

$$\text{mU/cubeta} = (dA_{340nm}/0,00622) \times 0,408\text{mL} \quad [6]$$

$$\text{mU/mL} = \text{mU/cubeta} \times (1000/\text{volume de amostra em } \mu\text{L}) \quad [7]$$

$$\text{U/g de proteínas} = (\text{mU/mL}) / (\text{Proteínas totais em mg/mL}) \quad [8]$$

### 3.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para determinação do genótipo da enzima mercúrio redutase.

A reação da amplificação do gene *merA* seguiu o protocolo com modificações Chadhain e colaboradores (2006). Essa parte do trabalho realizado em colaboração com o Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Para a reação da PCR foi utilizado um volume final de 25 $\mu$ L nas reações de amplificação contendo: 3 $\mu$ L do lisado bacteriano e 2,5 $\mu$ L de tampão 10X (Invitrogen) e volumes suficientes para alcançar 2mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2mM de dNTPs (Invitrogen), 30pmol/ $\mu$ L de cada iniciador e 1U/ $\mu$ L de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação foi realizada em um termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) e programada para uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 45 ciclos de 94°C por 10 segundos, 68°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos. As condições de eletroforese foram: Aproximadamente 10 $\mu$ L dos produtos resultantes das PCRs foram adicionados de 2 $\mu$ L de tampão de corrida (*gel loading buffer* - Invitrogen) e submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,3% (p/v) preparado em Tris-Borato-EDTA 0,5x na voltagem constante de 70V durante cerca de 3 horas e 30 minutos. Após a eletroforese o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (Invitrogen) a 0,5 $\mu$ g/mL durante um período de 15 minutos e submetido à lavagem em água destilada durante cerca de 30 minutos. O gel foi inspecionado visualmente em trans-iluminador de luz ultravioleta (UVITec, Cambridge, Reino Unido) e fotografados em sistema de captura de imagem digital (UVIPro silver, Cambridge, Reino Unido). Para estimar o tamanho dos fragmentos obtidos foi utilizado o padrão de 100pb DNA ladder (Invitrogen). Como controles de reação foram incluídas as cepas de *E. coli* ATCC 35218, conhecida como resistente, e *E. coli* ATCC 23724, conhecida como sensível ao mercúrio.

### **3.12 Análises estatísticas**

Todas as determinações bioquímicas foram feitas pelo menos duas vezes com diferenças inferiores a 10%. Todas as Regressões Lineares foram feitas pelo método dos Quadrados Mínimos, com auxílio de uma planilha eletrônica (EXCEL 2007, Microsoft) e a dispersão dos dados foi expressa pelo Coeficiente de Determinação ( $r^2$ ).

### **3.13 Revisão da literatura**

Durante os trabalhos experimentais foi feita uma revisão criteriosa do assunto estudado através das bases Scopus e Web of Knowledge. Também foram criados alertas que enviaram a informação de qualquer artigo publicado através de e-mail. As palavras usadas na revisão e no alerta, para as duas bases, foram: “mercur\* reductase” e “mercur\* ion reductase”.

A seleção dos trabalhos levou em consideração as seguintes questões: (a) a indicação de alguma metodologia para a seleção de bactérias para uso na biorremediação de mercúrio e (b) a indicação de alguma metodologia para a determinação da enzima mercúrio reductase.

---

## 4 Resultados

### 4.1 Coleta de amostras de água e isolamento de bactérias.

Foram coletadas amostras de água superficial nas cinco regiões brasileiras. Na região Norte foram coletadas amostras no estado de Rondônia, no entorno da Represa que se localiza no Baixo Jamari, afluente direto da bacia do rio Madeira. Na região Nordeste as coletas ocorreram no Ceará em rios próximos a áreas urbanas de Fortaleza e no rio Jaguaribe, na altura do município de Itaiçaba, e também em Pernambuco nos rios Ipojuca e Beberibe. Na região Sudeste as coletas ocorreram no complexo lagunar da baixada de Jacarepaguá, em lagoas de Niterói e em rios que compõem a bacia da Baía da Guanabara. Na região Sul as amostras foram coletadas no sistema lagunar da Lagoa dos Patos, na Lagoa Mirim e nos Arroios Grande e Del Rei. Na região Centro-Oeste as coletas foram feitas em pontos do rio Teles Pires e do rio Paranaíta, no município de Paranaíta, e em lagos de criação de peixes em antigas cavas de garimpo do município de Alta Floresta no estado de Mato Grosso. Estas coletas totalizaram 51 amostras de águas superficiais, conforme está descrito na Tabela 1. As 51 amostras de água originaram 143 isolados bacterianos tolerantes a 5  $\mu\text{M}$  de Hg(II) sendo 31 da região Norte, 26 da Região Nordeste, 19 da Região Centro-Oeste, 41 da Região Sudeste e 26 da Região Sul (Tabela 1).

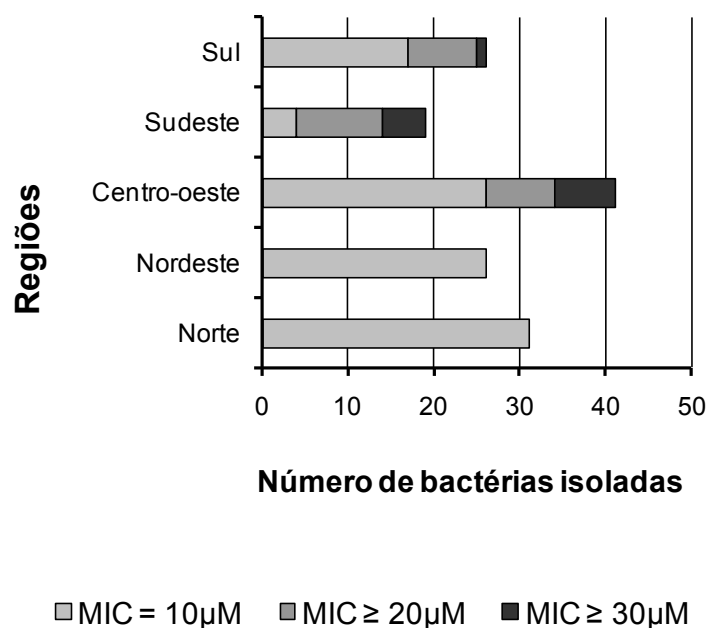
**Tabela 1** – Distribuição das coletas e dos isolamentos para cada Região do Brasil

<b>Região</b>	<b>Número de amostras de água coletadas</b>	<b>Número de bactérias isoladas</b>
Norte	8	31
Nordeste	6	26
Centro-Oeste	15	19
Sudeste	13	41
Sul	9	26
<b>TOTAIS</b>	<b>51</b>	<b>143</b>

#### 4.2 Caracterização de amostras bacterianas com fenótipo de resistência ao mercúrio e taxonomia de bactéria selecionadas

Após o isolamento as 143 amostras bacterianas passaram pelo teste morfotintorial de Gram e pela determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de mercúrio. Os resultados de MIC por região estão especificados na Figura 1. Dos 143 isolados bacterianos encontrados 104 eram Gram-negativos, e 39 eram Gram-positivas. Dos 104 isolados bacterianos Gram-negativos, 30 mostraram tolerância igual ou superior a 20 $\mu$ M de Hg(II) e foram submetidos a identificação por testes bioquímicos comerciais (Kit de identificação), com predomínio de representantes da família Enterobacteriaceae, especialmente os gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*. Dentre os 39 organismos classificados como Gram-positivos 9 apresentaram MIC igual ou superior a 20 $\mu$ M de Hg(II), sendo os representantes da família Bacillaceae pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* e da família Staphilococceae pertencente ao gênero *staphilococcus*.

Após a identificação de 39 cepas, foram escolhidas 13 cepas que apresentaram o maior MIC, sendo este igual ou superior a 30 $\mu$ M de Hg(II), (conforme Tabela 2), e foram testadas quanto a sensibilidade a antibióticos. No antibiograma foram usados oito antibióticos através do método de difusão por discos. Todas as seis bactérias Gram-positivas escolhidas apresentaram multirresistência aos antibióticos testados e foram guardadas em um banco de cepas para trabalhos posteriores. As sete bactérias Gram-negativas, três apresentaram multirresistência, três apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados e somente uma bactéria, a amostra M23, foi sensível a todos os oito antibióticos usados no teste (Tabela 3).



**Figura 1** - Distribuição geográfica e tolerância ao mercúrio das 143 bactérias isoladas nas diversas regiões do Brasil

MIC - Concentração mínima inibitória ( $\mu\text{M}$ ) de Hg(II) pelo método MIC<sup>1</sup>

**Tabela 2** - Distribuição dos gêneros das amostras isoladas tolerantes às maiores concentrações de mercúrio.

Gênero	Gram	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>		
		30	40	45
<i>Enterobacter</i>	neg	1		
<i>Klebsiella</i>	neg	5		
<i>Leclercia</i>	neg	1		
<i>Bacillus</i>	pos	1	1	1
<i>Paenibacillus</i>	pos		1	
<i>Staphylococcus</i>	pos			2

<sup>a</sup> MIC<sup>1</sup> utilizando Agar Nutriente  
13 amostras, sendo 7 Gram-negativas e 6 Gram-positivas



**Tabela 3** – Antibiograma das bactérias isoladas Gram-negativas e tolerantes a pelo menos 30 $\mu$ M de mercúrio

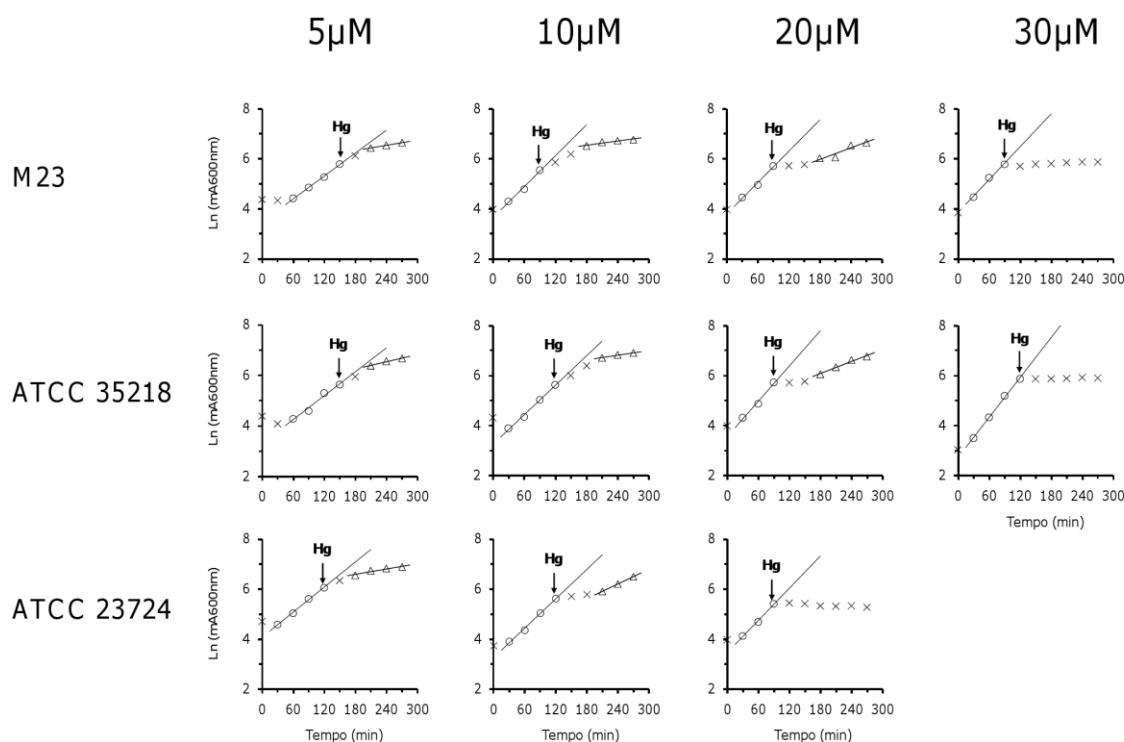
Gênero	N	Antibióticos							
		C	TE	S	NA	CN	SXT	K	AMP
<i>Enterobacter</i>	M291	S	R	S	S	S	S	S	R
<i>Klebsiella</i>	M187	S	S	S	S	S	S	S	R
	M186	S	S	S	S	S	S	S	R
	M213	R	R	S	R	R	R	R	R
	M216	S	R	S	R	R	S	R	R
	M255	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>Leclercia</i>	M23	S	S	S	S	S	S	S	S

N = Numeração na coleção de cultura; C = cloranfenicol (30 $\mu$ g), TE = tetraciclina (30 $\mu$ g), S = estreptomicina (300 $\mu$ g), NA = ácido nalidixico (30 $\mu$ g), CN = gentamicina (10 $\mu$ g), SXT = sulfametoxanol-trimetropim (25 $\mu$ g), K = canamicina (30 $\mu$ g), AMP = ampicilina (10 $\mu$ g).

#### 4.3 Desafio de células em fase exponencial de crescimento com mercúrio

Alguns trabalhos de seleção de bactérias para biorremediação de mercúrio descrevem experimentos que buscam comparar cepas bacterianas avaliando o comportamento de culturas em fase exponencial de crescimento frente à adição de Hg(II) (Ramaiah e De, 2003; Rojas *et al.*, 2011). A Figura 2 e a Tabela 4 expressam os resultados de desafio de células em fase exponencial de crescimento de 3 cepas tomadas como exemplo.

Foram usadas as cepas ATCC 35218 e a amostra isolada M23, reconhecidas como tolerantes ao mercúrio, e a cepa ATCC 23724, reconhecida como sensível ao mercúrio. Os resultados indicam que as duas cepas consideradas tolerantes suportam melhor a adição de mercúrio durante o crescimento exponencial.



**Figura 2** – Desafio de células bacterianas em crescimento exponencial com Hg(II).

**Condições experimentais:** Crescimento em Caldo LB, com adição de Hg(II) quando indicado, a partir de uma solução de Hg(II) em Caldo LB, de modo a atingir as concentrações indicadas em cada coluna de figuras. As Regressões Lineares mostram o curso do crescimento exponencial considerando somente os pontos que geraram um Coeficiente de Determinação ( $r^2$ ) de pelo menos 0,95. Condições de cultivo conforme descrito na Figura 2. Os pontos marcados com x não foram usados para a construção das regressões

**Tabela 4** – Tempos de geração (min) dos crescimentos exponenciais expressos na Figura 2.

**Condições experimentais:** Conforme descrito na Figura 2. Cálculos dos tempos de geração conforme descrito em Material e Métodos.

Amostras	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	Hg (II) depois do desafio							
		5 <sup>b</sup>		10		20		30	
		<i>A</i> <sup>c</sup>	<i>D</i> <sup>c</sup>	<i>A</i>	<i>D</i>	<i>A</i>	<i>D</i>	<i>A</i>	<i>D</i>
M23	30	46	192	34	249	33	89	32	sc
ATCC 35218	40	44	145	35	215	30	86	26	sc
ATCC 23724	20	42	193	30	71	32	sc		

<sup>a</sup> MIC realizado somente para estas 3 amostras em Agar LB (MIC<sup>2</sup>);

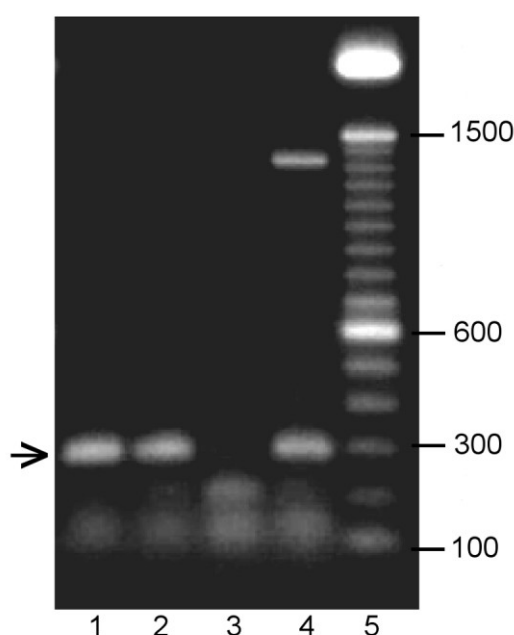
<sup>b</sup> Concentração final de Hg(II) em  $\mu\text{M}$  depois da adição indicada na Figura 2;

<sup>c</sup> Tempos de Geração em minutos antes (*A*) e depois (*D*) da adição de Hg(II).

sc = sem crescimento

#### 4.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para determinação do genótipo da enzima mercúrio redutase.

Confirmada a tolerância ao mercúrio da amostra isolada M23 (MIC 30 $\mu$ M) da ATCC 35218 (MIC 40 $\mu$ M) e da amostra bacteriana conhecida como sensível ATCC 23724 (MIC 20 $\mu$ M), buscamos verificar a presença do gene *merA*. Na Figura 3 é possível observar os fragmentos de DNA que correspondem ao gene *merA*, sendo consideradas positivas para este gene as duas amostras: ATCC 35218 e isolada M23.



**Figura 3** - Genotipagem de cepas bacterianas para o gene *merA*

**Condições experimentais:** 1, RM165, controle *merA*<sup>+</sup> *E.coli* selvagem; 2, *Escherichia coli* ATCC 35218, considerada positiva para o gen *merA* (*merA*<sup>+</sup>); 3, *Escherichia coli* ATCC 23724 considerada negativa para o gen *merA* (*merA*<sup>-</sup>); 4, Amostra isolada M23 (*Leclercia adecarboxylata*); 5, Padrões de peso molecular de DNA. A seta indica o fragmento esperado.

#### 4.5 Determinação da enzima mercúrio redutase

##### 4.5.1 Escolha das amostras

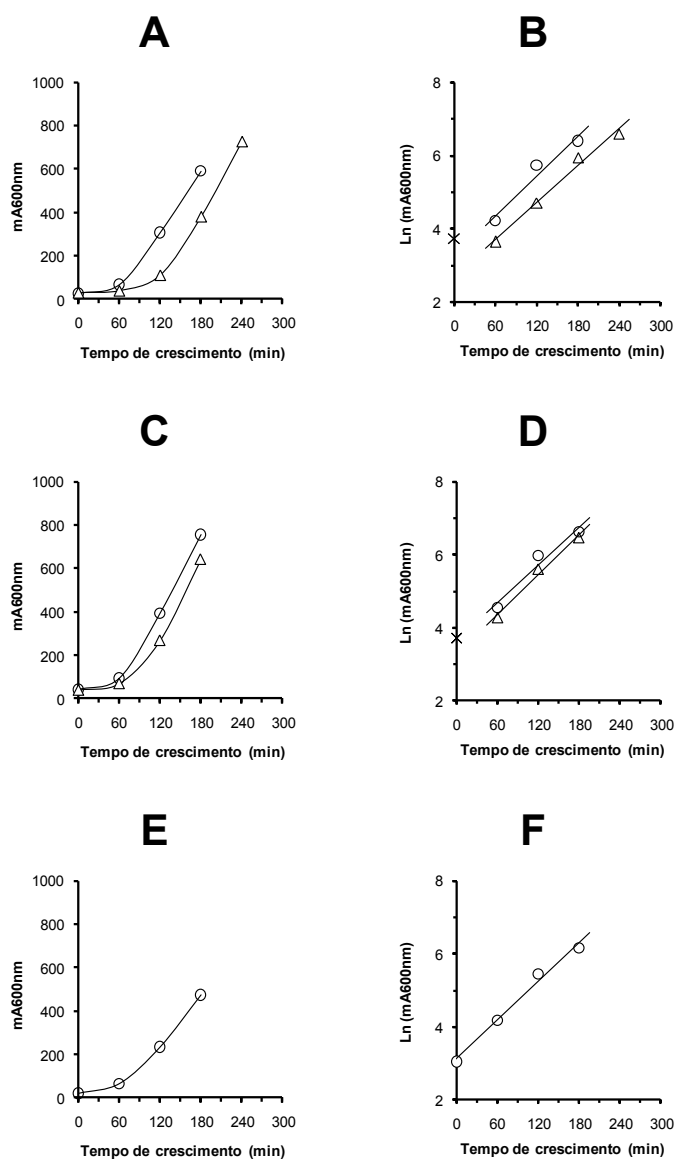
Para a padronização da determinação de mercúrio redutase (MerA) foram usadas as cepas ATCC 35218 e a amostra isolada M23, reconhecidas como resistentes ao mercúrio e portadoras do gene *merA*, e a cepa ATCC 23724, reconhecida como sensível ao mercúrio e negativa para o gene *merA*. A cepa isolada M23 foi escolhida por possuir MIC igual a 30 $\mu$ M e por questões de biossegurança, já que se mostrou sensível a todos os oito antibióticos testados.

#### **4.5.2 Produção de biomassa**

Para a determinação de MerA foram usadas células de fase exponencial de crescimento celular obtidas através de culturas cujos inóculos foram adaptados ao mercúrio (Figura 4), somente a amostra ATCC 23724 não teve crescimento quando o meio de cultura continha mercúrio. A velocidade de crescimento foi muito parecida para todas as amostras (Tabela 5).

#### **4.5.3 Produção de fração solúvel**

Não foi possível garantir uma metodologia adequada para a produção de fração solúvel das cepas escolhidas. Os resultados mostraram que o tratamento com pérolas de vidro e Vortex, indicado na literatura para lise de bactérias em processos de pequena escala (Song e Jacques, 1997; Benov e Al-Ibraheem, 2002; Ramanan *et al.*, 2008), foi pouco eficiente na lise das células em estudo, já que a morte das células entre o início e o fim dos tratamentos foi muito pequena ou não ocorreu. A ordem de grandeza do número de células viáveis foi da ordem de  $10^8$  células/mL mesmo depois dos tratamentos o que, em alguns casos, indicava aumento do número de células. Outra questão importante foi a quantidade de proteína. Os resultados expressos na Figura 5 mostram que a maior quantidade de proteína foi formada logo na preparação para o primeiro ciclo de tratamento, com apenas 5 segundos de agitação, aumentando pouco nos demais 10 ciclos, sejam de 20 ou de 60 segundos. Na Figura 6 podemos comparar as quantidades de proteína antes e depois dos 10 ciclos de tratamento e fica muito claro o baixo rendimento dos tratamentos se comparados com os 5 segundos iniciais.



**Figura 4** - Produção de biomassa de bactérias Gram-negativas

A e B = Amostra isolada M23 (*Leclercia adecarboxylata*), considerada tolerante ao mercúrio

C e D = Amostra ATCC 35218 (*Escherichia coli*), considerada tolerante ao mercúrio

E e F = Amostra ATCC 23724 (*Escherichia coli*), considerada sensível ao mercúrio

**Condições experimentais – Células adaptadas:** Caldo LB, sem (círculos) ou com (triângulos) a adição de 5 μM de Hg(II), frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 100mL de cada meio, agitação orbital a 120rpm, 37°C. O inoculo foi adaptado no mesmo meio por plaqueamento de uma amostra do estoque em meio sólido e isolamento de colônia para 4mL de meio líquido cultivado por 16 horas a 37°C. Os símbolos × representam os pontos que foram desconsiderados quando do cálculo dos tempos de geração.

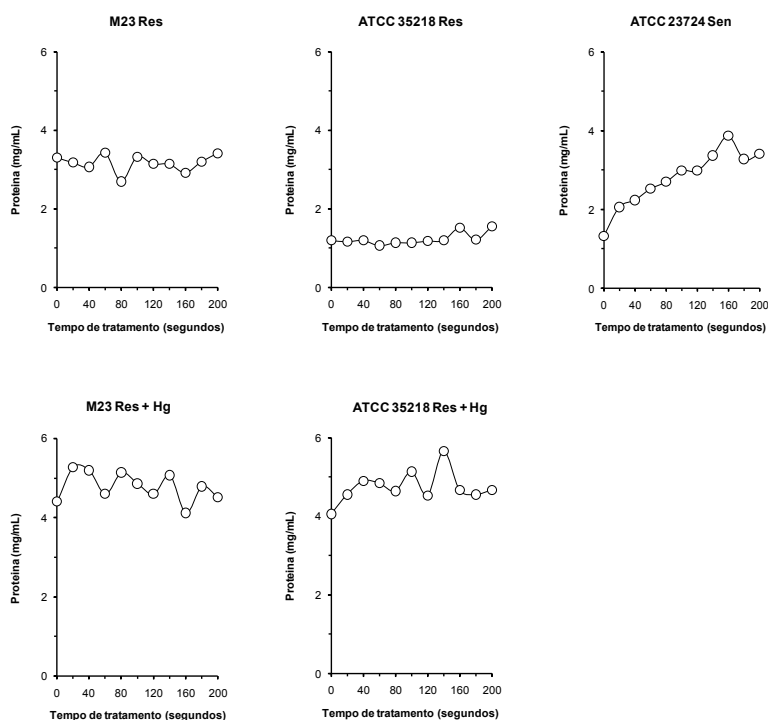
A, C e E expressam as curvas de crescimento e B, D e F as regressões lineares para o cálculo dos Tempos de Geração, conforme descrito em Material e Métodos.

**Tabela 5** - Parâmetros das determinações de Tempo de Geração expressas na Figura 4.

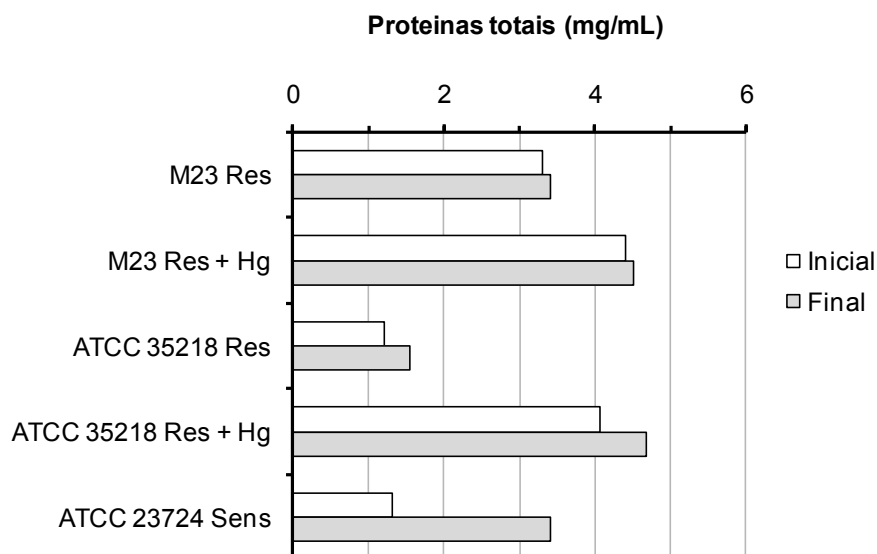
**Condições experimentais:** Biomassa cultivada em Caldo LB, com ou sem a adição de 5 $\mu$ M de Hg(II), em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 100mL de cada meio, agitação orbital a 120rpm, 37°C. O inóculo foi adaptado no mesmo meio por plaqueamento de uma amostra do estoque em meio sólido e isolamento de colônia para 4mL de meio líquido cultivado por 16 horas a 37°C.

Condições	Parâmetros	
	Tempo de Geração (min)	r <sup>2</sup>
M23	38	0,949053
M23 + Hg	41	0,985997
ATCC 35218	40	0,954713
ATCC 35218 + Hg	38	0,985411
ATCC 23724	39	0,987187

r<sup>2</sup> = Coeficiente de Determinação das Regressões lineares expressas na Figura 4.

**Figura 5** - Lise da biomassa com pérolas de vidro.

**Condições experimentais:** Biomassa cultivada conforme descrito na Figura 4. As células foram coletadas no meio da fase log de crescimento, lavadas 3 vezes com salina e suspensas no mesmo volume de Tampão de Lise até uma turvação de 5 de Absorvância a 600nm. Depois da adição de pérolas de vidro (0,5mm) na proporção de 1g/mL de suspensão bacteriana, a biomassa foi tratada com 10 ciclos de 20 segundos de agitação em Vortex na potência máxima alternados com 20 segundos em banho de gelo.



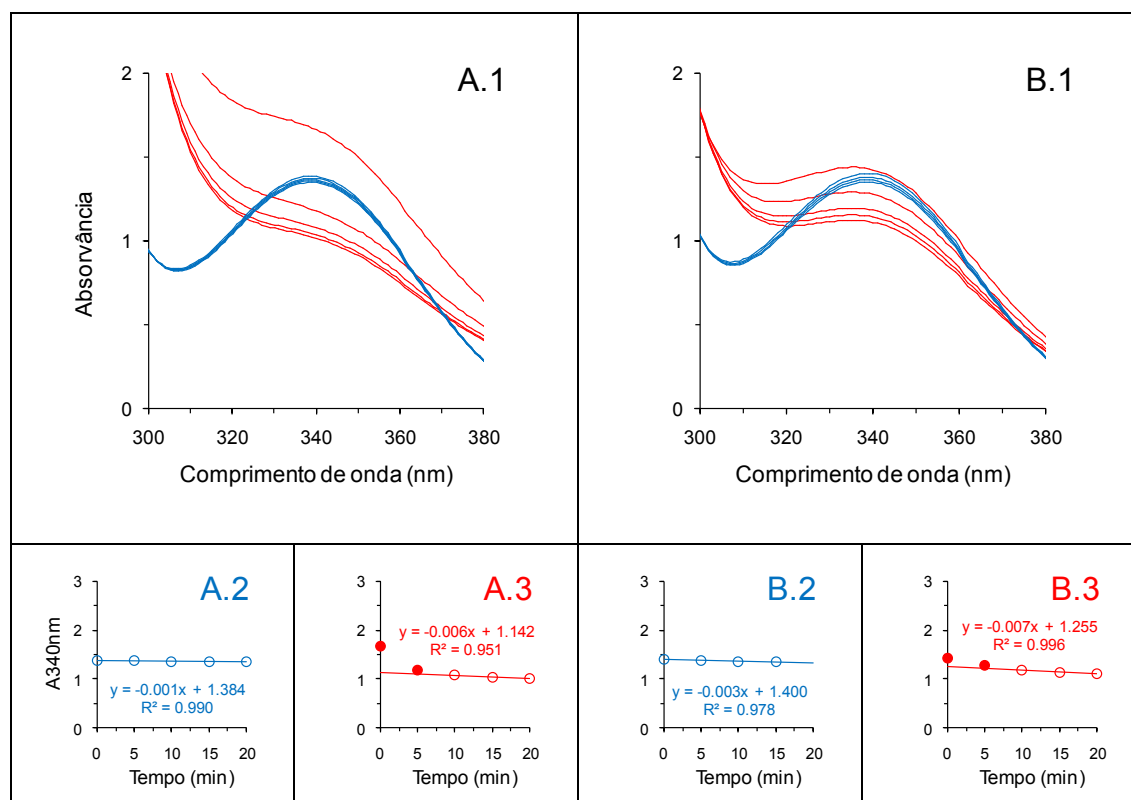
**Figura 6** - Rendimento de geração de proteína solúvel depois do tratamento das biomassas bacterianas com pérolas de vidro e Vortex

**Condições experimentais:** Conforme Figura 5

#### 4.5.4 *Reação enzimática e quantificação da enzima*

Um estudo fotométrico do curso da reação de MerA mostrou que Hg(II) reage com componentes da amostra e com o NADPH alterando o seu espectro de absorção. Os espectros de absorção descritos na Figura 7, na Figura 8 e na Figura 9, e as curvas de decaimento de  $A_{340\text{nm}}$  expressas nestas mesmas figuras, indicam que existe alguma reação entre o mercúrio e o NADPH, que foi diferente dependendo da amostra de fração solúvel bacteriana presente na dosagem. Um estudo dos espectros de absorção de cada componente da reação enzimática comprovou esta reação entre NADPH e Hg(II) (Figura 10).

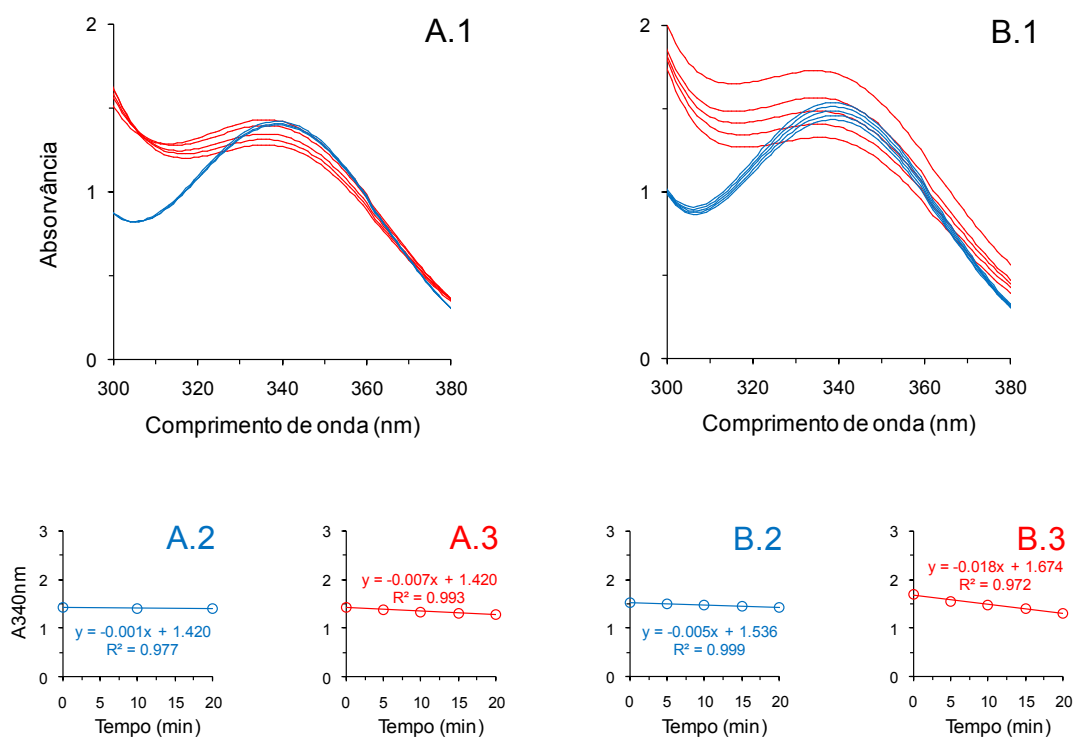
Outra questão importante é a normalização dos resultados de atividade enzimática. As grandes variações observadas na quantidade de proteína da fração solúvel, ou no rendimento de formação de proteínas depois da lise celular (Figura 6), não permitiram concluir adequadamente quais são os teores de atividade de MerA na fração solúvel das três cepas testadas (Tabela 6).



**Figura 7** - Avaliação fotométrica do curso da reação da enzima mercúrio redutase presente na fração solúvel da amostra isolada M23 (*Leclercia adecarboxylata*) cultivada na ausência (A) e na presença (B) de mercúrio.

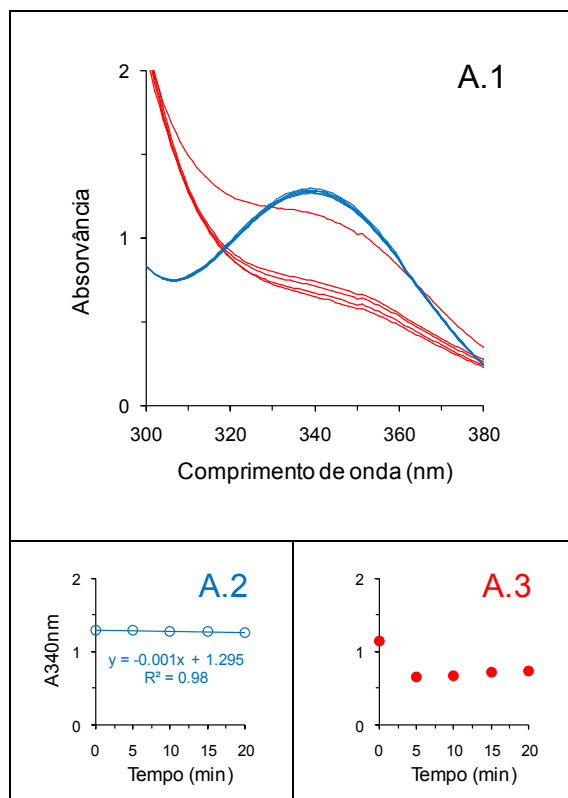
**Condições experimentais:** Crescimento em Caldo LB, com adição de 5 $\mu$ M de Hg(II) quando indicado, conforme condições descritas na Figura 4 e tratamento da biomassa conforme descrito na Figura 5. A fração solúvel foi centrifugada a 35.000g por 30min antes do uso. O meio reacional continha: 50mM tampão fosfato (Fluka) pH 7,2; 0,2mM MgSO<sub>4</sub>; 0,5mM EDTA; 1mM DTT; 0,2mM NADPH; 0,1mM Hg(II). A1 e B1 mostram os espectros de absorção do meio reacional a cada 5min antes (azul: A2, B2) e depois da adição de Hg(II) (vermelho: A3, B3). As Regressões Lineares mostram o curso da reação pela Absorvância a 340nm considerando os pontos que geraram um Coeficiente de Determinação ( $r^2$ ) de pelo menos 0,95. Os gráficos maiores (.1) expressam os espectros de comprimento de onda a cada cinco minutos de reação antes (azul) e depois (vermelho) da adição de Hg(II). Os gráficos menores (.2 e .3) expressam o decaimento da Absorvância a 340nm a cada cinco minutos antes (azul) e depois (vermelho) da adição de Hg(II).





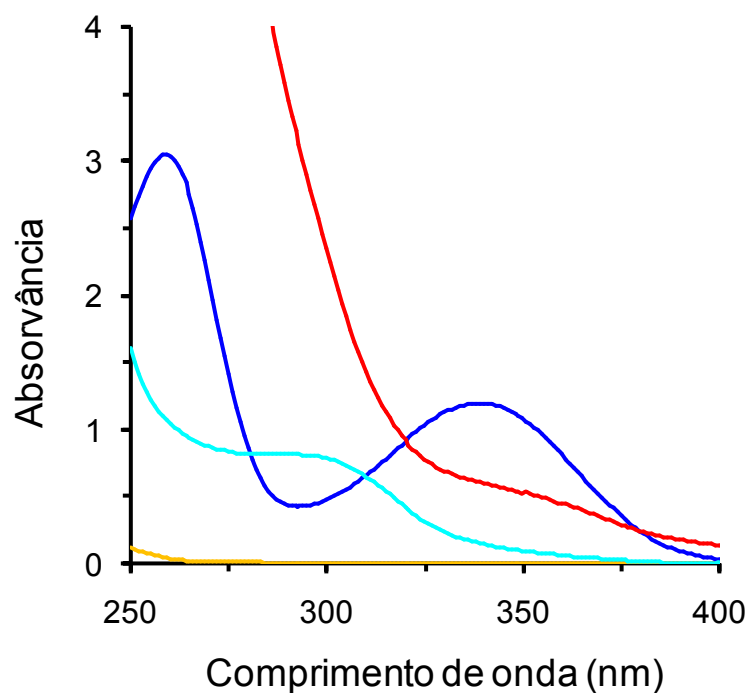
**Figura 8** - Avaliação fotométrica do curso da reação da enzima mercúrio redutase presente na fração solúvel da amostra ATCC 35218 (*Escherichia coli*) cultivada na ausência (A) e na presença (B) de mercúrio.

**Condições experimentais:** Conforme Figura 7. Os gráficos maiores (.1) expressam os espectros de comprimento de onda a cada cinco minutos de reação antes (azul) e depois (vermelho) da adição de Hg(II). Os gráficos menores (.2 e .3) expressam o decaimento da Absorvância a 340nm a cada cinco minutos antes (azul) e depois (vermelho) da adição de Hg(II).



**Figura 9** - Avaliação fotométrica do curso da reação da enzima mercúrio redutase presente na fração solúvel da amostra ATCC 23724 (*Escherichia coli*) cultivada na ausência de mercúrio.

**Condições experimentais:** Crescimento em Caldo LB, sem adição de Hg(II), conforme condições descritas na Figura 7. Os gráficos maiores (.1) expressam os espectros de comprimento de onda a cada cinco minutos de reação antes (azul) e depois (vermelho) da adição de Hg(II). Os gráficos menores (.2 e .3) expressam o decaimento da Absorvância a 340nm a cada cinco minutos antes (azul) e depois (vermelho) da adição de Hg(II).



**Figura 10** - Avaliação fotométrica do meio reacional para a determinação da enzima mercúrio redutase.

**Condições experimentais:** Leituras fotométricas feitas contra água destilada. **Amarelo:** Tampão de dosagem (TpDos = 50mM tampão fosfato, 1mM DTT, 0,2mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5mM EDTA); **Azul:** TpDos + NADPH; **Verde:** TpDos + Hg(II); **Vermelho:** TpDos + NADPH + Hg(II).

**Tabela 6** – Parâmetros da determinação de atividade da enzima mercúrio redutase da fração solúvel de bactérias Gram-negativas.

**Condições experimentais:** M23 = Amostra isolada identificada como *Leclercia adecarboxylata* positiva para o gen *merA*; ATCC 35218 e 23724, amostras de *Escherichia coli* positiva (35218) e negativa (23724) para o gen *merA*; Atividades de mercúrio redutase conforme as inclinações das Regressões Lineares expressas na Figura 7, na Figura 8 e na Figura 9.

Condições de cultivo <sup>1</sup>	Proteínas totais (mg/mL)			Variação da Absorvância (miliA340nm/min)			Atividade de MerA			
	Inicial	Final	Rendimento	Antes da adição de Hg	Depois da adição de 200µM de Hg	Atividade corrigida	mU/0,08mL	mU/mL	mU/mg Ptn (final)	mU/mg Ptn (rendimento)
M23	3,3	3,4	0,1	1	6	5	0,33	4,1	1,2	37,4
M23 + Hg	4,4	4,5	0,1	3	7	4	0,26	3,3	0,7	31,0
ATCC 35218	1,2	1,6	0,4	1	7	6	0,39	4,9	3,2	13,9
ATCC 35218 + Hg	4,1	4,7	0,6	5	18	13	0,85	10,7	2,3	17,5
ATCC 23724	1,3	3,4	2,1	1						

<sup>1</sup>As bactérias foram crescidas na ausência e na presença de 5µM de Hg, conforme curvas de crescimento expressas na Figura 4, e os extratos celulares foram produzidos conforme Figura 5 e Figura 6.

## 5 Discussão

Para a biorremediação de águas poluídas com mercúrio usando bactérias é necessário que tenha bactérias resistentes a mercúrio. O objetivo deste trabalho foi gerar critérios de seleção de um micro-organismo encontrado no ambiente natural brasileiro que tenha o gene *merA*, com a enzima Mercúrio Redutase (MerA) ativa para transformar o íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ), mais tóxico, em mercúrio metálico ( $\text{Hg}^0$ ), menos tóxico, mais volátil a temperatura ambiente.

Para que uma bactéria seja classificada como resistente ou sensível ao mercúrio não existe na literatura um valor de referencia e nem se o meio de cultura mais adequado para os testes sejam em estado sólido ou líquido, como existem indicações para os testes com antibióticos. As soluções e meios de cultura contendo mercúrio assim como outros metais não permanecem instáveis por muito tempo. O mercúrio, por exemplo, pode ser perdido para as paredes dos frascos por adsorção, pode ser volatilizado para o meio externo ou precipitar (Ramamoorthy e Kushner, 1975). Embora seja muito difícil comparar os resultados dos trabalhos já publicados, o nível de mercúrio para seleção inicial do micro-organismo neste estudo foi  $5\mu\text{M}$  de  $\text{Hg}(\text{II})$ , mesmo que exista uma grande variação nos valores de  $\text{Hg}(\text{II})$  nos meios de cultura. Fazendo uma revisão na literatura foi possível encontrar resultados de seleção de micro-organismos parecidos com o deste estudo, trabalhos realizados na Europa e na América do Norte indicaram a presença de bactérias tolerantes a  $5\mu\text{M}$  de  $\text{Hg}(\text{II})$  como o trabalho de Tamar Barkay (1987), Rasmussen e Sorensen, (1998) e Reyes e colaboradores (1999). Na Índia o trabalho realizado por Ramaiah e De (2003), em ambientes costeiros da Índia também usaram este valor para uma seleção inicial de bactérias. Fizeram uma avaliação ecológica usando bactérias tolerantes a mercúrio como indicador de poluição ao longo da costa da Índia no período de 1993 a 1999.

No presente estudo foi possível observar bactérias tolerantes ao  $\text{Hg}(\text{II})$ , em todas as regiões brasileiras onde foram coletadas amostras de água superficial. Das cinco regiões brasileiras em apenas três foram encontrados MIC mais elevados deste trabalho igual ou maior que  $30\mu\text{M}$  de  $\text{Hg}(\text{II})$ , sendo estas as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste. Todas estas regiões sofrem ação antropogênica direta pelo desenvolvimento das áreas urbanas e industriais. A região Sul e Sudeste são regiões com parques industriais o que possibilitaria o meio ambiente está impactado, na região centro-oeste os locais de coleta de água foram áreas de

---

alagamento que compõem uma represa. Este resultado confirma dados de literatura que indicam que a resistência ao mercúrio está relacionada com a pressão seletiva ambiental que o micro-organismo sofreu, mas cada vez mais estudos demonstram a resistência bacteriana ao mercúrio em ambientes sem históricos de impactos por este metal, indicando que a presença do Hg(II) pode ser vista até em regiões polares, devido a distribuição de poluentes globais de origem antropogênica. (Mindlin *et al.*, 2005; Poulain *et al.*, 2007).

As identificações bacterianas realizadas nesta dissertação encontraram predominantemente, as Gram-negativas da família Enterobacteriaceae, conforme resultados encontrados por Summers *et al.*, (1993), com isolados da flora bucal, por Ramaiah e De (2003) que identificaram Enterobacteriaceae e *Pseudomonas*, em sistemas aquáticos da Índia, Essa *et al.*, (2003) trabalhou com Enterobacteriaceae isolados do Japão e Giovanella e Bento (2011) em amostras de efluentes líquidos de indústrias que continham resíduo de Hg(II), na região Sul do Brasil. As amostras Gram-positivas foram da família Bacillaceae em semelhança com estudos anteriores de Moore (1960), que trabalhou demonstrando a resistência destas espécies a mercúrio e Wang *et al.*, (1988) que trabalhou com a indução de atividade enzimática.

A resistência a antibióticos representa uma crescente ameaça à saúde pública global. (Levy e Marshall, 2004). Inicialmente a resistência a antibióticos foi relatada em bactérias patogênicas de isolados clínicos. Com estudos posteriores, foi observado, a associação entre resistência a mercúrio e a antibióticos, o mercúrio também teve seu uso muito marcante em hospitais como desinfetante e no tratamento de doenças bacterianas (Moore, 1960; Summers *et al.*, 1993). A resistência na família Enterobacteriaceae é um fenômeno frequente, conforme resultado encontrado por Lima-Bittencourt *et al.*, (2007) que trabalhou com 111 isolados de Enterobacterias de água doce, cerca de 93% apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico enquanto que 61% apresentou multirresistência. Nesta dissertação as cepas bacterianas que apresentaram MIC igual ou maior 30µM de Hg(II) passaram por teste de sensibilidade a antibióticos e das 13 cepas testadas 12 apresentaram resistência a pelo um antibiótico, ampicilina, somente a amostra M23 (*Leclercia*) foi sensível a todos conforme tabela 3. Por apresentar este fenótipo de sensibilidade aos antibióticos, sendo este um critério de biossegurança, para dar continuidade aos testes e por possuir um MIC elevado, 30µM de Hg(II) esta cepa foi selecionada para passar por testes

genéticos para identificação da presença do gene *merA* e atividade da enzima mercúrio redutase (MerA).

O crescimento celular das cepas testadas foi similar tanto para as resistentes quanto para sensível ao mercúrio, o tempo de geração variou pouco, ficando entre 38 e 41 minutos (Figura 4 e Tabela 5), sendo muito próximos entre si. O crescimento celular não foi afetado pela adição de baixas concentrações de mercúrio quando a cepa já foi cultivada na presença de Hg. No entanto, quando concentrações de mercúrio são adicionadas na fase exponencial de crescimento celular é possível observar que a célula reorganizou suas funções bioquímicas, alterou o tempo de geração mais continuou em fase linear de crescimento conforme desafio proposto na Figura 2. Os resultados encontrados com uma cepa *Enterobacter* relatam que, quando as concentrações de mercúrio encontradas no meio de cultura reduzem por via química ou redução biológica, a célula iniciou seu crescimento em taxas normais (Vaituzis *et al.*, 1975).

O efeito do Hg na morfologia celular foi observado, em condições experimentais nas quais o mesmo organismo quando cultivado na presença de Hg(II) apresentou uma consistência viscosa dificultando a diluição e o plaqueamento, não sendo observado este fenômeno na ATCC sensível. A presença do mecanismo de resistência ao Hg pode alterar estruturas de membranas como os resultados encontrados por Horitsu e Ito em 1980, que compararam a fração solúvel de duas cepas *Pseudomonas* de uma mesma origem parental, na qual uma era sensível e outra resistente ao Hg(II) e encontraram diferenças na quantidade de proteínas, a cepa quando resistente a Hg(II) teve 2,4 vezes mais proteínas na fração solúvel, a presença do mecanismo de resistência pode dificultar o rompimento da célula e impossibilitar a normalização por dosagem de proteínas, causando dificuldade de interpretação dos resultados conforme o encontrado nas Figuras 5 e 6 que descrevem a lise da biomassa celular com pérolas de vidro.

Com o uso deste primer desenhado por Chandhain e colaboradores (2006) indicado para amostras ambientais, foi possível encontrar a amplificação do gene *merA* nas amostras ATCC 35218 (*E. coli*) e M23 (*Leclercia adecarboxylata*), com este resultado classificamos estas amostras como resistentes ao mercúrio. A cepa ATCC 23724 não apresentou nenhum fragmento sendo considerada sensível ao mercúrio. Embora nenhum fragmento tenha sido amplificado para a amostra ATCC 23724 (*E. coli*) é possível sugerir que existam outros mecanismos que permitem que esta cepa tolere algumas concentrações de mercúrio, como por

exemplo, o bloqueio do íon tóxico, ele é impedido de entrar na célula, ou caso entre na célula é imobilizado em vesículas (Osborn *et al*, 1997, Nies,1999 Mathema *et al*, 2011). Estes outros mecanismos alternativos de tolerância ao mercúrio não foram estudados neste trabalho. Outra possibilidade é que esta amostra possua uma sequência de gene *merA* muito diferente que não foi capaz de ser detectada por esta metodologia.

Um estudo fotométrico do curso da reação de MerA mostrou que Hg(II) reage com componentes da amostra e com o NADPH alterando o seu espectro de absorção, conforme espectros mostrados na Figura 10 (curva em vermelho). Ocorreu uma queda brusca nos primeiros 5 minutos de reação até com alguma elevação dos valores de  $A_{340nm}$ , este comportamento foi mais intenso com amostras crescidas na presença de mercúrio e também foi mais intenso com a amostra isolada do ambiente (Figura 7) do que com a amostra padrão (Figura 8). Estes resultados indicaram a necessidade de escolher uma parte das curvas de decréscimo da  $A_{340nm}$ , descontando as variações que ocorrem logo após a adição do Hg(II), como mostram as regressões lineares da Figura 7, partes A.3 e B.3. Mesmo as quedas de  $A_{340nm}$  antes da adição de mercúrio, usadas como um controle do consumo de NADPH, foram mais acentuadas com amostras crescidas na presença de mercúrio.

Os resultados obtidos com uma amostra bacteriana sensível ao mercúrio indicam claramente a necessidade de se usar somente uma parte das variações de  $A_{340nm}$  depois da adição do mercúrio, conforme demonstra a Figura 9. Se a queda de  $A_{340nm}$  nos primeiros 5 minutos fosse usada, teríamos um valor muito alto para a MerA, que não está presente nesta amostra. As variações nos próximos 15 minutos, no entanto, foram até positivas, indicando ausência da atividade de MerA.

Um estudo do meio reacional na ausência de amostras (Figura 10) indicou que também o NADPH reage com o Hg(II) formando um novo composto com uma alteração significativa do espectro de absorção. A queda de  $A_{340nm}$  fica bem evidente. Estes resultados indicam a necessidade de um estudo mais detalhado do modo mais correto para a avaliação de MerA.

A escolha de uma parte dos 20 minutos de reação na presença de mercúrio não resolve completamente este problema, pois as reações com componentes da amostra, com variações na absorção de luz a 340nm, também deve estar acontecendo nos 15 minutos finais da reação. Mas, os resultados quantitativos expressos na Tabela 6 foram coerentes usando como normalização o volume de

---



amostra (mU/mL). No entanto, normalizando os resultados com os teores de proteínas totais, as amostras crescidas na ausência de mercúrio teriam atividades muito maiores do que as amostras crescidas sem o inibidor (mU/mg). Como as células criadas na presença de mercúrio são mais viscosas, a lavagem da biomassa é mais difícil e deve estar trazendo proteínas que não são da fração solúvel. As proteínas precisam ser somente as da fração solúvel do citoplasma bacteriano para que possam ser usadas como um normalizador da atividade de MerA nas diversas células. As células cultivadas na presença ou na ausência de mercúrio devem sofrer alterações na composição protéica do citoplasma, mas estas alterações não podem ser da ordem que foi observada nestes testes. Outros testes foram feitos, tais como: desprezar o sobrenadante da primeira etapa de lise e aumento do número de lavagens, cujo objetivo era garantir uma avaliação de MerA que, de fato, expresse a potência daquela biomassa na transformação de  $Hg^{2+}$  em  $Hg^0$ . Entretanto, os mesmos não foram conclusivos.

Os resultados apresentados por Takeushi e colaboradores (Takeuchi *et al.*, 1999), indicam que a presença de citocromo-c oxidase resistente a mercúrio, associada com a presença de MerA, confere maior tolerância ao mercúrio para amostras de *Thiobacillus ferrooxidans*. Neste trabalho os autores, além de determinar a atividade de MerA pelo decaimento de NADPH na presença de mercúrio e extratos bacterianos livres de células, compararam as mesmas amostras de bactérias pela volatilização de mercúrio por células intactas e obtiveram resultados muito semelhantes. Estes resultados foram reavaliados pelo Dr. Moacelio V. Silva Filho da Fundação Oswaldo Cruz, buscando a comparação da determinação quantitativa da atividade de MerA pelo decaimento de NADPH por extratos bacterianos e pela volatilização de mercúrio por células intactas. Este trabalho foi iniciado na busca de uma alternativa para a determinação da enzima MerA que pudesse contornar os problemas analíticos desta determinação usando a medida fotométrica do decaimento de NADPH, conforme indicam os resultados do presente trabalho.

Os cálculos desta reavaliação dos dados apresentados por Takeushi e colaboradores (1999) mostraram uma total correspondência entre estas duas formas de avaliar a atividade de MerA, o decaimento fotométrico de NADPH e a volatilização de mercúrio, como forma de seleção de uma bactéria mais eficiente na remoção de mercúrio (Figura 11 e Tabela 7). Mas, é preciso ressaltar que para estes cálculos foi necessário desconsiderar a parte inicial da curva de decaimento de NADPH, tal qual foi feito no presente trabalho (Figura 7 e Figura 8). Outra

questão que merece destaque é a leitura inicial de Absorvância a 340nm apresentada pelos autores, ao redor de 0,45. Esta leitura, considerando a Absortividade do NADPH como  $6.220\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Dixon e Webb, 1979), indicaria uma concentração inicial deste substrato ao redor de  $70\mu\text{M}$ , muito abaixo dos  $200\mu\text{M}$  descrito pelos autores. A oxidação espontânea do NADPH poderia explicar esta diferença, mas a reatividade com o mercúrio, conforme indicam os nossos resultados (Figura 9), pode ser a explicação mais correta para estes resultados mais baixos para a Absortividade do NADPH.

Mesmo assim, desde que sejam contornados os problemas para a quantificação da atividade de MerA, o decaimento de NADPH na presença de mercúrio é a forma mais simples de avaliar esta enzima. Mas, a possibilidade de determinar MerA sem romper as células permite contornar duas operações unitárias muito difíceis: o rompimento de células bacterianas e a produção de fração solúvel por ultracentrifugação. Takeuchi e colaboradores não indicam a forma de rompimento das células no artigo de 1999 mas descrevem a preparação dos extratos celulares por centrifugação a 105.000 gravidades. Um artigo recente do mesmo grupo de pesquisa (Sugio *et al.*, 2010) informa que foi usada uma Prensa Francesa para o rompimento das células, um indicativo de que esta deve ter sido a operação unitária usada em 1999 pelo mesmo grupo. A eficiência destas duas metodologias na preparação dos extratos celulares precisa ser destacada para que a comparação entre as cepas bacterianas possa ser feita por determinação quantitativa da atividade da enzima MerA pelos dois métodos.

Além disso, é necessário ter certeza de que os níveis no interior da célula, garantidos pelo mercúrio extracelular, foram suficientes para a saturação da MerA. O transporte de mercúrio para dentro de células que possuem o gene *mer* é facilitada pela presença de uma proteína que seqüestra o mercúrio na proximidade da membrana — MerP — e de uma proteína de transporte — MerT — (Barkay *et al.*, 2003), ambas com reação espontânea aos respectivos substratos. Assim, a transferência do mercúrio do meio externo até a enzima MerA no interior da célula, de fato, acontece por uma sequência de eventos de transferência do mercúrio entre proteínas com maior afinidade pelo metal, culminando na reação do mercúrio com a fração N-terminal da MerA (Barkay *et al.*, 2003, Benison *et al.*, 2004).

A reavaliação dos resultados de Takeushi e colaboradores é mais um indicador deste efeito cascata no transporte de mercúrio por células bacterianas que possuem o gene *mer*. Outro resultado desta reavaliação que indica que o transporte

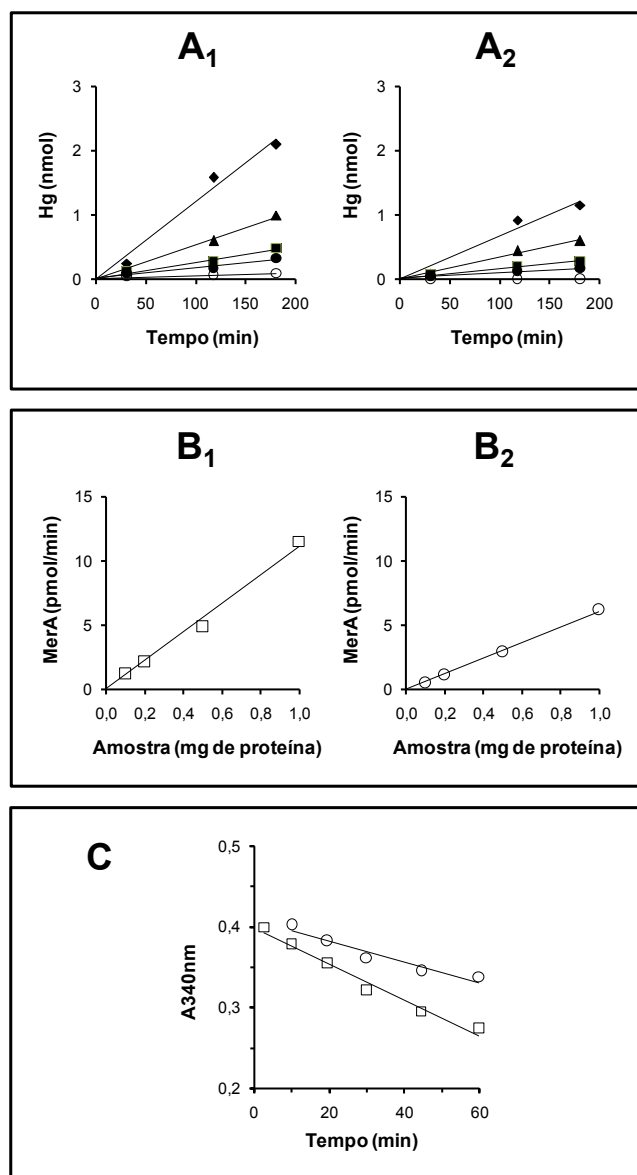
---

de mercúrio por estas células não é uma barreira energética é a “Curva de Enzima” (Figura 11 parte B), montada com os resultados da volatilização do mercúrio. Em primeiro lugar, é preciso destacar que esta formação de mercúrio ficou estável por até três horas de reação, conforme indica a linearidade das curvas de formação de mercúrio volátil, ou curva de produto da reação enzimática (Figura 11, parte A).

As taxas de formação deste produto para cada quantidade de amostra, ou a inclinação das respectivas Regressões Lineares descritas da Figura 11 parte A, expressam a “molaridade de mercúrio volátil produzido por hora”, que são “curvas de produto” para a enzima MerA. Ao replotar estas inclinações contra as respectivas quantidades de amostra, expressa pelos autores como “quantidade de proteína total da biomassa”, podemos construir duas novas regressões, uma para cada bactéria (Figura 11 parte B), que são “curvas de enzima” para a MerA intracelular. Segundo Dixon e Webb (1979, pgs 48-54), a total correlação entre a medida da atividade enzimática e a quantidade de amostra, neste caso a quantidade de proteína de biomassa, expressas pelas regressões forçadas à zero da Figura 11 parte B e pelos parâmetros da Tabela 7, é uma garantia da pureza da amostra enzimática e dos substratos usados na reação.

Nesta situação, temos como substratos o mercúrio extracelular e o NADPH contido, ou sintetizado, pelas células intactas. Podemos considerar que, respeitadas estas indicações, os resultados de Takeushi e colaboradores (1999) para a produção de mercúrio volátil por células intactas de bactérias são a expressão da reação enzimática limitante neste processo, neste caso a redução catalítica de mercúrio pela enzima MerA intracelular. Desta forma, a medida da formação de mercúrio volátil por células bacterianas intactas em estado não proliferativo pode ser uma boa alternativa para os problemas analíticos evidenciados no presente trabalho. Outra alternativa, que pode contornar o problema de algumas cepas de Enterobacter que são capazes de retirar mercúrio de águas poluídas mas que acumulam o mercúrio metálico na sua biomassa (Sinha e Khare, 2011), é a determinação do mercúrio residual quando do teste de volatilização do mercúrio, e não do metal volatilizado (Rojas *et al*, 2011).

---



**Figura 11** - Recálculo dos dados apresentados na Figura 2 (A e B) e na Figura 4 (C) de Takeushi et al (1999)

**A** = Transcrição dos pontos experimentais da Figura 2A (A<sub>1</sub>) e 2B (A<sub>2</sub>), que representam os pontos de determinação da quantidade de mercúrio volátil liberado por células em repouso (*resting cells*) da cepa Funis 2-1 (A<sub>1</sub>) e AP19-3 (A<sub>2</sub>) da bactéria *Thiobacillus ferrooxidans* para uma planilha eletrônica e construção das respectivas Regressões Lineares com as constantes forçadas a zero. Cada linha foi construída com diferentes quantidades de proteína de cada biomassa (losângulo 1,0mg; triângulo 0,5mg; quadrado 0,2mg; círculo cheio 0,1mg; círculo vazio 0mg). Estas linhas representam as curvas de formação de produto da enzima MerA (Hg<sup>0</sup>) para várias quantidades de amostra (proteína total de células intactas).

**B** = Construção de Regressões Lineares com as inclinações obtidas em A para as duas bactérias. Estas linhas representam as curvas de quantidade de enzima para a enzima MerA presente dentro das células.

**C** = Transcrição dos pontos experimentais da Figura 4, para as mesmas bactérias usadas no experimento descrito na Figura 2 (quadrados representam a bactéria 1 e círculos representam a bactéria 2) do artigo original, e construção das respectivas Regressões Lineares. Estas curvas representam a determinação da atividade da enzima MerA pelo decaimento dos níveis de NADPH por extratos celulares na presença de mercúrio. Foram desconsiderados os pontos iniciais das curvas devido ao forte decaimento provocado pela adição do mercúrio, usado na iniciar a reação enzimática.

**Tabela 7** - Parâmetros do recálculo das Figuras 2 e 4 de Takeushi *et al* (1999) através das Regressões Lineares expressas na Figura 11.

**A** - Dados recalculados referentes à Figura 2 do artigo original para a formação de mercúrio volátil por células inteiras expressas na Figura 11 parte A:

Espécie	Cepa	[Hg] inicial (nmol)	[Hg] volátil (nmol)	MerA <sup>a</sup> (pmol/min/mg Ptn)	r <sup>2</sup>
<i>T.ferrooxidans</i>	(1) Funis 2-1	7	2,03	<b>11,14</b>	0,99562
	(2) AP19-3	7	1,11	<b>6,08</b>	0,99908

**Cepa** = Identificação das amostras na coleção dos autores; <sup>a</sup> Calculada à partir da Figura 2 de Takeushi et al (1999), transcrita na Figura 11 parte A, com os dados de inclinação expressos na Figura 11 parte B; r<sup>2</sup> = Coeficiente da Determinação de MerA através das inclinações das Regressões Lineares expressas na Figura 11 parte B.

**B** - Dados recalculados referentes à Figura 4 do artigo de Takeushi *et al* (1999) e expressos na Figura 11 parte C para a determinação de MerA pelo decaimento dos níveis de NADPH na presença de mercúrio e extratos livres de células:

Espécie	Cepa	[NADPH] A340nm/min	MerA <sup>a</sup> (pmol/min/cubeta)	r <sup>2</sup>
<i>T.ferrooxidans</i>	(1) Funis 2-1	-0,00223	<b>896</b>	0,97789
	(2) AP19-3	-0,00128	<b>514</b>	0,92982

**C** - Comparação entre as amostras pelas duas metodologias de avaliação de MerA:

Espécie	Cepa	[Hg]	[NADPH]
<i>T.ferrooxidans</i>	(1) Funis 2-1	11,14	896
	(2) AP19-3	6,08	514
<b>Eficiência (1 / 2)</b>		<b>1,83</b>	<b>1,74</b>

## 6 Conclusões

- Foi possível isolar bactérias tolerantes a 5µM de mercúrio de amostras de água das cinco regiões geográficas do Brasil.
  - As bactérias com maior nível de tolerância foram isoladas de amostras de água das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul, com níveis de tolerância iguais ou superiores a 30µM de Hg(II).
  - A maioria das bactérias isoladas que foram tolerantes ao mercúrio são espécies da família Enterobacteriaceae.
  - A cepa selvagem *Leclercia adenocarboxylata* (M23) trabalhada nesta dissertação possui potencial de uso em biorremediação de mercúrio, por apresentar o fenótipo de sensibilidade aos principais antibióticos e possuir o gene *merA*.
  - Foi observada uma alta correlação entre a resistência ao antibiótico ampicilina e a tolerância ao mercúrio entre as amostras isoladas de todas as regiões geográficas brasileiras.
  - A adição de mercúrio a células bacterianas no meio da fase exponencial de crescimento foi capaz de demonstrar diferenças significativas entre bactérias positivas e negativas para o gene *merA*, indicando uma nova metodologia para seleção de bactérias tolerantes ao mercúrio.
  - A determinação da atividade da enzima mercúrio redutase pelo decaimento dos níveis do substrato NADPH sofre interferências causadas pela presença do mercúrio, que reage com este substrato alterando a sua absorvidade de luz a 340 nanômetros, dificultando a quantificação da reação enzimática.
  - A seleção de bactérias tolerantes ao mercúrio, com vistas a um processo de biorremediação, não precisa usar a determinação da atividade de mercúrio redutase em frações celulares livre de células como critério de seleção, sendo possível indicar os níveis desta enzima através de métodos indiretos como a volatilização de mercúrio por células intactas e o desafio com mercúrio de células na fase exponencial de crescimento celular.
-

## 7 Referências Bibliográficas

- Andrews, J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (Suppl. S1): 5-16.
- Azevedo, F. A. (2003). *Toxicologia do mercúrio*. RIMA São Paulo, 292 p. Brasil.
- Barkay, T., (1987) Adaptation of aquatic microbial communities to Hg<sup>2+</sup> Stress. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (12): 2725-2732.
- Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 355-384.
- Benison, G.C.; Lello, P. Di.; Shokes, J. E.; Cosper, n. J.; Scott, R. A.; Legault, P.; Omichinski, J. G.(2004) A Stable Mercury-Containing Complex of the Organomercurial Lyase MerB: Catalysis, Product Release, and Direct Transfer to MerA. *Biochemistry* 43: 8333-8345
- Benov, L. & Al-Ibraheem, J. (2002) Disrupting *Escheriachia coli* : A comparison of methods. Short communication. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35 (4): 428-431.
- Bisinoti, M. C., Jardim, W. F. (2004) O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. *Quím. Nova*, São Paulo, 27 A(4).
- Clarkson, T. (2002). The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect, Reviews* 110 (Suppl 1): 11-23.
- Chadhain, S. M. N.; Shaefer, J. K.; Crane, S.; Zylstra, G. J.; Barkay, T.; (2006) Analysis of mercuric reductase (merA) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. *Environmental Microbiology* 8 (10): 1746-1752.
- De, J.; Ramaiah, N.; Vardanyan, L. (2008) Detoxification of toxic metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Marine Biotechnology* 10: 471-477.
- Dixon, M.; Webb, E. C.(1979) *Enzymes*. Longman Third edition.
- Dorea, J.G. (2003) Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations? *Environmental Research* 92: 232–244
- Ekino, S.; Susa, M.; Ninomiya, T. (2007) Minamata diseases revisited: Na update on the acute and chonic in if a stations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences* 262 (1-2): 131-144.
- Enviromental Protection Agency - EPA. (2001) *Mercury update: impact on fish advisories*.
-

- Essa, A.M.; Julian, M. D. J.; Kidd, S. P.; Brown, N. L.; Hobman, J. L (2003). Mercury Resistance Determinants Related to Tn21, Tn1696, and Tn5053 in Enterobacteria from the Preantibiotic Era. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 47 (3): 1115–1119.
- Eto, H. (1997). Pathology the Minamata disease. *Toxicologic. Pathology* 25 (6): 614-623.
- Fox, B. e Walsh, C. T. (1982) Mercuric Reductase: Purification and Characterization of a transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide. *The Journal of Biological Chemistry* 257 (5): 2498-2503.
- Furukawa, K.e Tonomura, K. (1972). Metallic mercury-releasing Enzyme in Mercury-resistant *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry* 36 (2): 217-226.
- Giovanella, P.; Bento, F. (2011). Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. *Química Nova* 34 (2): 232-236
- Harada, M. (1995). Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. *Critical Reviews in Toxicology* 25 (1): 1-24
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167-182.
- Lacerda, L. D. & Malm, O. (2008) Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. *estudos avançados* 22 (63) p.173-190
- Levy, S. B. & Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Review. Nature Medicina Supplement* 10 (12) 122-129
- Lima-Bittencourt1, 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. *Genetics and Molecular Research* 6 (3): 510-521
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.(2000). *Brock biology of microorganismos*. New Jersey, Prentice Hall.
- Manual Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing(CLSI antigo NCCLS, M100-S18, V.28,n.1, january, 2008).
- Mathema, V. B.; Thakuri, B. C.; Sillanpaa, M. (2011) Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Archives of Microbiology* 193 (12): 837-844.
-



- Miller, S. M.; Massey, V.; Williams Jr, C. H.; Ballou, D. P.; Walsh, C. T. (1991). Communication between the active sites in dimeric mercuric ion reductase: an alternating sites hypothesis for catalysis. *Biochemistry*, 30: 2600-2612.
- Mindlin, S.; Minakhin, L.; Petrova, M.; Kholodii, G.; minakhina, S.; Gorlenko, A.; Nikiforov, V. (2005) Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since the Upper Pleistocene. *Research in Microbiology* 156: 994 -1004.
- Miranda, M., Coelho-Souza, S., Guimarães, J., Correia, R., Oliveira, D. (2007) Mercúrio em Sistemas Aquáticos: Fatores Ambientais que Afetam a Metilação. *Oecologia Brasilienses-Ecologia de micropulentes orgânicos e metais pesados*.11(2): 240-251
- Moore, B. (1960). A new screen test and selective médium for the rapid detection of epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2: 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: 543-556.
- Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 730-750.
- Novick, R. P.; Roth, C. (1968). Plasmid resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal Bacteriology*. 95: 1335-1342.
- Nriagu,J.O.(1979). The Biogeochemistry of mercury in the Environment: Topics in Environmental Health.Amsterdam, Elsevier/North Holla nd Biomedical Press. 2.
- 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.
- Ogunseitan, O. A. (1998) Protein method for investigating mercuric reductase gene expression in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2): 695-702.
- Poulain, A. J.; Chandhan, S. M. Ni.; Ariya, P. A.; Amyot, M.; Garcia, E.; Campbell, P. G. C.; Zylstra, G. J.; Barkay, T. (2007) Potential for Mercury Reduction by Microbes in the High Arctic *Applied and Environmental Microbiology* 73 (7): 2230–2238
- Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of lowry *et al.* Which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83, 346-356.
-

- Ramanan, R. N.; Ling, T. C.; Ariff, A. B.(2008). The performance of a glass bead shaking technique for the disruption of *Escherichia coli* cells Biotechnology and Bioprocess Engineering 13: 613-623.
- Ramaiah, N. & De, J. (2003) Unusual rise in mercury-resistant bacteria in coastal environs. Microbial Ecology 45: 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
- Reyes, N. S.; Frischer, M. E.; Sobecky, P. A. (1999) Characterization of mercury resistance mechanisms in marine sediment microbial communities. FEMS Microbiology Ecology 30 (6): 273-284.
- Richmond, M. H.; John, M. (1964) Co-transduction by a *staphylococcal*  $\lambda$  phage of the genes responsible for penicillinase synthesis and resistance to mercury salts. Nature 202: 1360-1361.
- Rojas, L. A.; Yanes, C.; Gonzales, M.; Lobos, S.; Smalla, K.; Seeger, M. (2011) Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 generated for mercury bioremediation. Plos One 6 (3): 17555
- Schottel, J.L.(1978) Mercury and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry 253 (12): 4341-4349
- Schue, M., Glendinning, K. J., Hobman, J. L., Brown, N. L. (2008) Evidence for direct interactions between the mercuric ion transporter (MerT) and mercuric reductase (MerA) from the Tn501 mer operon. Biometals 21:107–116
- Smalla, K.; Haines, A.S.; Jones, Karen.; Krogerrecklenfort, E.; Heuer, H.; Schloter, M.; Thomas, C. M. (2006) Increased Abundance of IncP-1\_ Plasmids and Mercury Resistance genes in mercury-polluted river sediments: first discovery of IncP-1\_ plasmids with a complex *mer* transposon as the sole accessory element. Applied and Environmental Microbiology 72 (11): 7253–7259.
- Sinha, A. & Khare, S. K. (2011) Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. cells and its alginate immobilized application. Biodegradation 23 (1): 25-34.
-

- Song, D. D. & Jacques, N. A. (1997) Cell Disruption of *Escherichia coli* By glass bead stirring for the recovery recombinant proteins. *Analytical Biochemistry* 248: 300-301
- Sugio, T.; Komoda, T.; Okazaki, Y.; Takeda, Y.; Nakamura, S.; Takeushi, F. (2010) Volatilization of metal mercury from organomercurials by highly mercuri-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 . *Biosciences Biotechnolgy Biochemistry* 74 (5): 1007-1012.
- Summers, A. O.; Wireman, J.; Vimy, M.J. Lorscheider, F.L.; Marshall, B.; Levy, S. B.; Bennett, S.; Billard, L.(1993). Mercury released from dental “Silver” fillings provokes an increase in mercury and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (4): 825-834.
- Suzuki, T.; Furukawa, K.; Tonomura, K. (1968). Studies on the Removal of Inorganic Mercurial. *Journal Fermentation Technology* 46 (12): 1048-1055.
- Takeushi, F.; Iwahori, K.; Kamimura, K.; Sugio, T. (1999). Isolation and some properties of *Thiobacillus ferrooxidans* strains with differing levels of mercury resistance from natural environments. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88 (4): 387-392.
- Tonomura, K.; Nakagami, T., Futai, F.; Maeda, K. (1968). Studies on the Action of Mercury-resistant Microorganisms on Mercurials. *Journal Fermentation Technology* 46 (6): 506-512
- United Nations Environment Programme – UNEP. (2002) *Chemicals*. 270
- Vaituzis, Z.; Nelson Jr., J. D.; Wan, L. W.; Colwell, R. R.(1975) Effects of mercuric chloride on growth and morphology of selected bacteria strains of mercury-resistant. *Applied Microbiology* 29 (2): 275-286.
- Vasconcellos, A. C. S. (2010) Avaliação da resistência bacteriana ao mercúrio através da quantificação da redução do Hg(II) ao estado elementar. Rio de Janeiro-RJ Brasil 131 pags (Dissertação de mestrado).
- Wang, Y.; Moore, M.; Levinson, H. S; Silver, S.; Walsh, C.; Mahler, I. (1988) Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistance determinant from a *Bacillus* sp. with broad-spectrum mercury resistance. *Journal of Bacteriology* 74 (1): 83-92.
- Zeyaulah, Md.; Nabi, G.; Malla, R.; Ali, A. (2007). Molecular studies of *E. coli* mercuric reductase gene (*merA*) and its impact on human health. *Nepall Medical College Journal*, 9 (3): 182-185.
-

Zeyoullah, Atif, M.; Islam, B.; Abdelkaf, A. S.; Sultan, P.; Elsaady, M. A.; Ali, A. (2009). Bioremediation: A tool for environmental cleaning. Review. African Journal of Microbiology Research 3 (6): 310-314.

Zeyoullah, Md.; Badrul, I.; Ali, A. (2010). Isolation, identification and PCR amplification of *merA* gene from highly mercury polluted Yamuna river. African Journal of Biotechnology, 9 (24): 3510-3514.

Zeyoullah, Md.; Haque, Shafiul.; Nabi, G.; Nand, K.N.; Ali, A. (2010) Molecular cloning and expression of bacterial mercuric reductase gene. African Journal of Biotechnology. 9 (25): 3714-3718

---