

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia Molecular

Gustavo Bombardelli Barp

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A MERCÚRIO ISOLADAS
DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO**

**Porto Alegre
2022**

Gustavo Bombardelli Barp

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A MERCÚRIO ISOLADAS
DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a Dra^a Emilene Mendes Becker

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Barp, Gustavo
CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A MERCÚRIO
ISOLADAS DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO /
Gustavo Barp. -- 2022.
50 f.
Orientadora: Emilene Becker.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Resistência bacteriana. 2. Mercúrio. 3.
Microbiologia. 4. Bioprospecção. 5. Biorremediação. I.
Becker, Emilene, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gustavo Bombardelli Barp

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A MERCÚRIO ISOLADAS DO
ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
bacharel em Biotecnologia - Ênfase em
Biotecnologia Molecular do Instituto de Biociências
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Emilene Mendes Becker

Porto Alegre, 5 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a. Emilene Mendes Becker

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr^a. Marilene Henning Vainstein

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr. Charley Christian Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora do trabalho de conclusão de curso e de todos esses anos de iniciação científica, Emilene Mendes Becker, pelo carinho, entusiasmo e disposição no planejamento e execução de cada projeto.

A todos os colegas, mestrandos e doutorandos dos laboratórios 217, 219, 220 e 222 do Centro de Biotecnologia, especialmente à Maiara e ao Matheus, pela amizade e suporte no trabalho nos momentos mais delicados.

À professora Marilene Henning Vainstein e ao professor Charley Christian Staats por cederem parte do espaço para que este projeto fosse executado.

Aos meus colegas de casa, Augusto, Guilherme e Vinícius pela amizade, companheirismo e carinho em todos esses anos de convívio, e aos demais amigos que sempre me apoiaram.

Aos amigos que fiz na graduação e na época do IFRS por todos os momentos sérios e momentos de descontração.

Aos meus pais e primos pelo apoio, presença e incentivo a ir cada vez mais longe.

RESUMO

As atividades industriais, queima de combustíveis fósseis e a mineração são responsáveis por grande parte da emissão de mercúrio na atmosfera. Os corpos d'água, eventualmente acabam por ser destino dessas emissões, e também são a porta de entrada desse metal tóxico e não-essencial na cadeia alimentar. Enquanto bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato e metanogênicas transformam o mercúrio a metilmercúrio, outras bactérias resistentes são capazes de reduzir o mercúrio a mercúrio elementar, que é menos tóxico e biodisponível, evitando a entrada de grande parte do mercúrio na alimentação. Neste trabalho, foram isoladas bactérias em incrustações do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, localizado na região equatorial do Oceano Atlântico a 1000 km do litoral do Rio Grande do Norte, com potencial aplicação na remediação de mercúrio. Inicialmente foi realizada uma varredura dos isolados empregando o crescimento celular em 25 μM de HgCl_2 em dois meios de cultura distintos (BHI e LB). Os microrganismos isolados foram submetidos a teste de sensibilidade em placa baseado em CFU. Além disso, tiveram gene rRNA 16S sequenciado para sua identificação e a detecção molecular do gene *merA*, o qual está ligado a resistência ao mercúrio. Ao todo, oito de 39 microrganismos selecionados preliminarmente passaram pelo teste de sensibilidade, seis isolados tiveram gene rRNA 16S sequenciado, sendo cinco potencialmente do gênero *Aeromonas* sp ou *Oceanimonas* sp, e um do gênero *Sporosarcina* sp. Dois isolados do gênero *Aeromonas* sp ou *Oceanimonas* sp tiveram *merA* detectado. Os resultados são condizentes com as características morfológicas das bactérias, local de isolamento e resultados de tolerância a mercúrio. Estudos mais aprofundados devem ser realizados para aplicação biotecnológica dos isolados.

Palavras-chave: mercúrio; resistência; bactérias; ASPSP.

ABSTRACT

Industrial activities, burning of fossil fuels and mining are responsible for a large amount of mercury emissions into the atmosphere. Water bodies eventually end up being the destination of these emissions and are also the gateway for this toxic and non-essential metal into the food chain. Whereas some anaerobic sulfate-reducing and methanogenic bacteria convert mercury into methylmercury, some resistant bacteria are able to reduce mercury to elemental mercury, which is less toxic and bioavailable and may help preventing a big amount of mercury to enter the diet. In this work, bacteria were isolated from incrustations in Archipelago of Sao Pedro e Sao Paulo, located in the equatorial region of the Atlantic Ocean, 1000 km away from the Rio Grande do Norte coast, with potential application in mercury remediation. Initially, isolates were screened through cell growth in 25 μ M of HgCl₂ in two distinct culture medium (BHI and LB). Microorganisms isolated were subjected to a CFU-base plate sensitivity assay. In addition, their 16S rRNA gene was sequenced for their identification and the molecular detection of the *merA* gene was performed, linked to mercury resistance in bacteria. Altogether, eight of 39 microorganisms selected preliminarily were submitted to sensitivity test and six isolates had the 16S rRNA gene sequenced. Five were identified as potentially from the *Aeromonas* sp or *Oceanimonas* sp genus, and one from the *Sporosarcina* sp genus. Two isolates from *Aeromonas* sp or *Oceanimonas* sp genus had *merA* gene detected. The findings are consistent with the morphological characteristics of the bacteria, collection site and mercury tolerance results. Further studies must be carried out for applications in biotechnology of the isolates.

Keywords: mercury, resistance, bacteria, ASPSP.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Rotas de exposição ao mercúrio nos seres humanos..... | 13 |
| Figura 2: Ensaio de crescimento microbiano 72 horas dos isolados em meio LB líquido e na presença de cloreto de mercúrio..... | 28 |
| Figura 3: Ensaio de crescimento microbiano em 72 horas dos isolados em meio BHI líquido e na presença de cloreto de mercúrio..... | 29 |
| Figura 4: Crescimento comparativo dos isolados em meio líquido LB e BHI na presença de cloreto de mercúrio após 72 horas de exposição..... | 30 |
| Figura 5: Teste piloto de sensibilidade em gota..... | 33 |
| Figura 6: Teste 1 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB:... | 34 |
| Figura 7: Contagem de CFU do teste 1 de sensibilidade em meio ágar-LB..... | 35 |
| Figura 8: Resultado do Teste 1 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB em água do mar..... | 36 |
| Figura 9: Teste 1 de sensibilidade em gota baseado em CFU em água do mar..... | 37 |
| Figura 10: Teste 2 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB.. | 38 |
| Figura 11: Resultados do Teste 2 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB..... | 39 |
| Figura 12: Teste 2 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB em água do mar..... | 40 |
| Figura 13: Teste 2 de sensibilidade em gota baseado em CFU em ágar-LB com água do mar..... | 41 |
| Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da PCR do gene rRNA 16S dos isolados resistentes..... | 42 |
| Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da PCR do gene rRNA 16S dos isolados resistentes..... | 44 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Principais genes do operon <i>mer</i> e funções de suas proteínas..... | 15 |
| Tabela 2: Condições de coleta das amostras do ASPSP..... | 27 |
| Tabela 3: Crescimento celular em meio líquido LB e BHI na presença de 25 µM de cloreto de mercúrio de microrganismos selecionados em 24 horas de crescimento. | 31 |
| Tabela 4: Microrganismos utilizados no ensaio de crescimento celular em meio líquido com mercúrio..... | 32 |
| Tabela 5: Potenciais gêneros bacterianos dos isolados resistentes..... | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASPSP: Arquipélago de São e São Paulo;

BDA: Ágar Batata-Dextrose;

BHI: Brain Heart Infusion (Infusão cérebro-coração), meio de cultura;

CFU: Unidades Formadoras de Colônias, do inglês, Colony-forming Unit;

ICLA: Incrustação da Fenda da Costa Leste A (local de coleta);

ICLB: Incrustação da Fenda da Costa Leste B (local de coleta);

ICR: Incrustação da Cratera (local de coleta);

ILA: Incrustação Livre A (local de coleta);

ILag: Incrustação da Lagoinha (local de coleta);

ILagPa: Incrustação do Parafuso da Lagoinha (local de coleta);

ILB: Incrustação Livre B (local de coleta);

IPV: Incrustação do Poço Verde (local de coleta);

IRA: Incrustação da Retenção A (local de coleta);

IRB: Incrustação da Retenção B (local de coleta);

LB: Luria-Bertani, meio de cultura;

MeHg: metilmercúrio;

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, do inglês, Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida (forma reduzida);

OMS: Organização Mundial da Saúde;

pb: pares de bases;

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês, Reactive Oxygen Species;

rRNA 16S: RNA ribossomal da subunidade 16S.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 1.1 CARACTERÍSTICAS E FONTES DE EMISSÃO DE MERCÚRIO..... | 11 |
| 1.2 A TOXICIDADE DO MERCÚRIO..... | 12 |
| 1.2.1 EFEITOS CELULARES..... | 12 |
| 1.2.2 EFEITOS PARA A SAÚDE HUMANA..... | 13 |
| 1.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANOS APLICADOS À BIORREMEDIAÇÃO..... | 14 |
| 1.3.1 BIORREMEDIAÇÃO A PARTIR DO OPERON <i>MER</i> | 14 |
| 1.3.2 BIORREMEDIAÇÃO A PARTIR DAS METALOTIONEÍNAS..... | 16 |
| 1.4 A BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES A MERCÚRIO..... | 17 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 19 |
| 3 OBJETIVOS..... | 20 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 20 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 20 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 21 |
| 4.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO (ASPSP)..... | 21 |
| 4.2 ENSAIO DE CRESCIMENTO CELULAR EM MEIO LÍQUIDO NA PRESENÇA DE MERCÚRIO..... | 22 |
| 4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE EM GOTA BASEADO EM CFU FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO..... | 23 |
| 4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PELO GENE DA SUBUNIDADE DE RNA RIBOSSOMAL 16S DE CANDIDATOS RESISTENTES..... | 25 |
| 4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GENE CODIFICADOR DA ENZIMA MERCÚRIO REDUTASE NOS ISOLADOS RESISTENTES..... | 25 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 27 |
| 5.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO (ASPSP)..... | 27 |
| 5.2 ENSAIO DE CRESCIMENTO CELULAR EM MEIO LÍQUIDO NA PRESENÇA DE MERCÚRIO..... | 27 |
| 5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE EM GOTA BASEADO EM CFU FRENTE A | |

| | |
|--|-----------|
| DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO..... | 31 |
| 5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PELO GENE DA SUBUNIDADE DE RNA RIBOSSOMAL 16S DE CANDIDATOS RESISTENTES..... | 39 |
| 5.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GENE CODIFICADOR DA ENZIMA MERCÚRIO REDUTASE NOS ISOLADOS RESISTENTES..... | 41 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 44 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 45 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 46 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS E FONTES DE EMISSÃO DE MERCÚRIO

O mercúrio é um elemento altamente tóxico, de característica não-essencial e que ocorre naturalmente na superfície e na atmosfera terrestre (MARTINEZ-FINLEY, 2014). Assim como outros metais, o mercúrio pode estar presente em diferentes estados de oxidação: forma elementar (Hg^0) – líquida a temperatura ambiente, inorgânica (Hg^+ , Hg^{2+} e seus sais, ex: HgCl_2) e orgânica (ex: metilmercúrio e etilmercúrio) todas as formas de mercúrio são tóxicas, a diferença está nos mecanismos de biotransformação em outros compostos de mercúrio e conseqüentemente nos sintomas da exposição e seus tratamentos (BROUSSARD, 2002).

O minério de cinábrio é a principal forma de obtenção do mercúrio ($\alpha\text{-HgS}$, 86,2% Hg), além de corderoito, livingstonita, metacinábrio e Hg nativo. A natureza volátil do mercúrio associada com o aumento da temperatura e seu longo tempo de retenção na atmosfera no ar, contribui para a maior disponibilidade do metal no ar (BECKERS, 2017).

Uma vez que o mercúrio é um elemento de ocorrência no meio ambiente, é comum que existam fontes naturais de emissão de mercúrio, as quais são possíveis citar: intemperismo e erosão de rochas – de ocorrência ubíqua, atividade geotérmica e erupções vulcânicas (BAGNATO, 2014). As fontes naturais emitem uma quantidade de 80 a 600 toneladas ao ano de mercúrio, enquanto as fontes antropogênicas são responsáveis pela emissão de mais de 2000 toneladas do metal anualmente (MASON, 2012; PNUMA, 2019). A entrada de mercúrio na atmosfera leva ao aumento progressivo da presença desse metal no ciclo atmosfera-solo-água, podendo permanecer por anos (RICE, 2014).

Entre as principais formas antropogênicas de emissão de mercúrio para a atmosfera, no ano de 2015, destacam-se: mineração de ouro em grande ou pequena escala (38%), combustão estacionária de carvão (21%), produção de metais não-ferrosos (15%) e produção de cimento (11%), descarte de resíduos com adição de mercúrio (7%), combustão estacionária de outros combustíveis (3%), produção de

metais ferrosos (2%) e outras fontes de emissão (2%) (PNUMA, 2019; BAIMENOV, 2020).

A acelerada emissão de mercúrio e seus efeitos nocivos para a saúde humana e animal fizeram com que, nas últimas décadas, fossem promovidas alternativas tecnológicas ao uso do mercúrio. No Brasil, a substituição de plantas do processo cloro-álcali fez despencar o consumo do mercúrio de 80 toneladas em 1979 para 18 toneladas em 1980. O uso de termômetros digitais, lâmpadas de diodos e pesticidas e fungicidas de nova geração são exemplos de substituição aos tradicionais produtos contendo mercúrio (BECKERS, 2017; GMA, 2013).

1.2 A TOXICIDADE DO MERCÚRIO

1.2.1 EFEITOS CELULARES

O mercúrio elementar pode ficar até um ano retido na atmosfera, contudo, seu destino final é a deposição e sedimentação em corpos d'água. Nos ambientes aquáticos, algumas linhagens de bactérias redutoras de sulfato, bactérias redutoras de ferro e metanogênicas são responsáveis pelo processo de metilação do mercúrio, transformando-o em metilmercúrio (MeHg). (ZHAO, 2020; OMS 2021; SEGADE, 2010). O metilmercúrio possui baixa solubilidade em água e relativa capacidade lipossolúvel, fazendo com que tenha maior capacidade bioacumulativa e biomagnificante através da cadeia alimentar em comparação às formas inorgânicas e elementar. Inicialmente o metilmercúrio é absorvido pelo fitoplâncton, em seguida ingerido pelo zooplâncton e peixes, e se acumula principalmente em espécies no topo da cadeia (RICE, 2014; PUTY, 2019; OMS, 2021; PANICHEV, 2014).

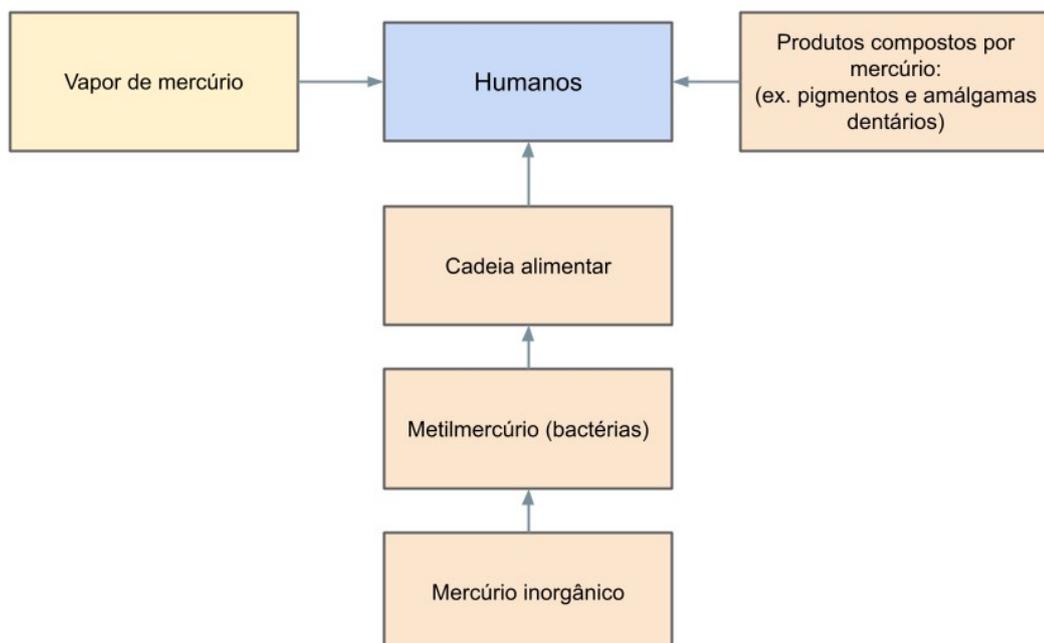
A nível celular, o mercúrio está associado a mudanças na permeabilidade de membranas, alterações na conformação de macromoléculas devido à sua afinidade por grupos sulfidríla e tiol, dano ao DNA e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), por ocupar espaço como catalisador em algumas reações bioquímicas. O mercúrio também pode induzir disfunção mitocondrial, resultando na alteração da homeostase de cálcio e aumento na peroxidação de lipídeos (RICE, 2014).

1.2.2 EFEITOS PARA A SAÚDE HUMANA

O metilmercúrio exerce um papel-chave na contaminação humana por mercúrio através da alimentação, outras formas de contaminação ocorrem pela ingestão de produtos que possuem mercúrio em sua composição e também através da inalação de vapor de mercúrio provocada pela combustão de produtos contendo mercúrio. A Figura 1 esquematiza algumas rotas importantes de exposição ao mercúrio (RICE, 2014).

Os sintomas e a intensidade dos mesmos variam frente a forma de exposição (inalação ou ingestão) e quantidade e intensidade de exposição (crônica ou intoxicação aguda).

Figura 1: Rotas de exposição ao mercúrio nos seres humanos



Fonte: adaptado de Rice, 2014.

A inalação e ingestão de mercúrio, independentemente da sua forma química, provocam efeitos citotóxicos no organismo que podem levar a uma série de efeitos multissistêmicos. Os efeitos podem incluir: danos digestórios e renais por intoxicação aguda ou crônica, efeitos cardiovasculares e sanguíneos como cardiomiopatia e anemia, efeitos neurológicos amplos como dor de cabeça,

alucinações, insônia, irritabilidade e neuropatia. Também pode se acumular e causar danos e interações indesejadas no sistema endócrino, especialmente se ligando a enzimas e proteínas estruturais com resíduos de cisteína e danos ao sistema reprodutor masculino e feminino, com perda de fertilidade (RICE, 2014).

Trabalhadores expostos a 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de mercúrio elementar no ar por vários anos, podem apresentar sinais subclínicos de neurotoxicidade. Os valores máximos de exposição propostos por orientação da OMS são: 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ de mercúrio total na água, 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de mercúrio elementar no ar (média anual) e uma ingestão máxima de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (OMS, 2021).

Por atravessar a barreira hematoencefálica e placentária, a exposição ao mercúrio também provoca danos embrionários, afetando o desenvolvimento do fetal (YOSHIDA, 2002).

1.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANOS APLICADOS À BIORREMEDIAÇÃO

1.3.1 BIORREMEDIAÇÃO A PARTIR DO OPERON *MER*

São inúmeras as bactérias resistentes a mercúrio, que por definição, são aquelas que possuem a capacidade de resistir e posteriormente transformar formas tóxicas de mercúrio em formas não-tóxicas. Um mecanismo de resistência a mercúrio é capaz de remover o mercúrio do meio de crescimento, por exemplo, pela ação de peptídeos com grupos que possuem alta afinidade ao mercúrio (tiois, sulfidríla) capazes de reduzir sua disponibilidade; pela presença de barreiras permeáveis que limitam a entrada de mercúrio para o interior das células; ou ainda através do operon *mer* (DASH, 2012; DASH 2017).

O uso de microrganismos na biorremediação de mercúrio exige a presença de algum mecanismo de processamento do metal, como biossorção, bioacumulação ou bioassimilação, captura e refluxo, imobilização, precipitação e complexação. Neste caso, o operon *mer* é uma ferramenta bastante útil e que vem sendo explorada pela biotecnologia nos últimos anos (BELTRAN-PINEDA, 2016).

O operon *mer* é composto por diversos genes que codificam proteínas

responsáveis pela autorregulação do operon, transporte e redução do mercúrio a Hg^0 , forma na qual pode ser volatilizado ou capturado por ligantes. Os genes do operon *mer* podem estar localizados no DNA genômico, nos plasmídeos, transposons ou integrons (DASH, 2012; IOHARA, 2001). De maneira simplificada, os principais genes do operon *mer* são listados conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Principais genes do operon *mer* e funções de suas proteínas

| Genes | Proteína codificada | Função |
|--------------------|---|---|
| <i>merA</i> | Mercúrio redutase | Redução de Hg^{2+} a Hg^0 no citoplasma |
| <i>merB</i> | Organo-mercúrio-liase | Lise da ligação C- Hg^+ no citoplasma |
| <i>merP</i> | Proteína de ligação a mercúrio periplasmática | Transferência de Hg^{2+} do espaço periplasmático às demais proteínas transportadoras de mercúrio |
| <i>merT</i> | Proteína transportadora de mercúrio | Transporte de mercúrio iônico para o citoplasma |
| <i>meD</i> | Proteína regulatória | Regulação positiva do operon <i>mer</i> |
| <i>merR</i> | Proteína regulatória | Regulação negativa do operon <i>mer</i> |
| <i>merC</i> | Proteína transportadora de mercúrio | Transporte de mercúrio iônico para o citoplasma |
| <i>merF</i> | Proteína transportadora de mercúrio | Transporte de mercúrio iônico para o citoplasma |

Fonte: adaptado de Dash, 2012

Há diferenças na configuração do operon e na estrutura das proteínas formadas em diferentes gêneros bacterianos, entretanto, são mantidas regiões conservadas de importância para seu funcionamento. De modo geral, o gene *merR* possui papel central na regulação do operon, sua transcrição é independente e ocorre a medida que há o aumento da concentração de Hg^{2+} no meio. Quando transcrito, a proteína MerR liga-se a região operadora, promovendo a transcrição

dos demais genes. Na ausência de mercúrio, MerR impede a transcrição dos genes. Enquanto isso, o gene *merD*, distal ao operon, é co-transcrito com seus demais genes e *merD* regula negativamente a transcrição dos outros genes ao competir pela região operadora com MerR. (DASH, 2012; NASCIMENTO AND CHARTONE-SOUZA, 2003). O Hg^{2+} se liga a resíduos de cisteína na proteína MerP, depois é transferido para MerT, proteína de membrana do citoplasma, onde novamente o mercúrio se liga aos resíduos de cisteína e em seguida para um par de cisteínas do sítio ativo da enzima MerA (mercúrio redutase), onde é transformado em Hg^0 num mecanismo dependente de NADPH (DASH, 2012).

Alguns operons possuem, além de outros genes, o gene *merB*, codificador da proteína organo-mercúrio-liase, bactérias que possuem ambos *merA* e *merB* são chamados de bactérias resistentes a mercúrio em amplo espectro. Microrganismos com gene *merB* funcional podem demonstrar resistência a formas orgânicas de mercúrio (DASH, 2012; NASCIMENTO AND CHARTONE-SOUZA, 2003).

Como ferramenta biotecnológica destacam-se pesquisas com utilização do operon *mer* como objeto de estudos genéticos de populações de microrganismos resistentes e seu contexto de isolamento em ambientes poluídos (IOHARA, 2001; MURTAZA, 2001), construção de microrganismos geneticamente modificados resistentes para a remoção de mercúrio em águas e solos (BELTRAN-PINEDA, 2016; PRIYADARSHANEE, 2022). Recentemente, esses estudos vem sendo mais aprofundados na área de engenharia genética com o uso de ferramentas auxiliares para captura de mercúrio, como biofilmes (DASH, 2017), utilização de *E. coli* portadora do operon *mer* com encapsulamento em sílica (KANE, 2016) e uma combinação de ferramentas auxiliares (ex: operon *mer* e metalotioneínas) (PRIYADARSHANEE, 2022).

1.3.2 BIORREMEDIAÇÃO A PARTIR DAS METALOTIONEÍNAS

Metalotioneínas (MTs) são proteínas de baixa massa molecular (6-7 kDa) ubíquas e ricas em cisteína, que podem se ligar a íons metálicos. A primeira metalotioneína bacteriana conhecida foi a SmtA induzida por Cd^{2+} de *Synechococcus*

sp. RRIMP N1 e em *Pseudomonas putida*. Proteínas homologas a SmtA também foram encontradas em: *Cyanobacteria*, *Pseudomonas*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, e *Firmicutes*. Atualmente, ainda se desconhece parte das funções das metalotioneínas mas sabe-se que atuam na homeostase de metais essenciais, como Zn^{2+} e Cu^+ e também interagem com metais tóxicos Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} e Ag^+ (NANDA, 2019).

É demonstrada a presença elevada de metalotioneínas na placenta de mamíferos, e, segundo estudos, elas podem exercer um papel protetivo diante da presença de mercúrio causada pela exposição materna (YOSHIDA, 2002). Também foi demonstrado o papel das metalotioneínas na redução da neurotoxicidade do mercúrio (YAO, 1999).

Liu et al., demonstraram e utilizaram de maneira eficiente um peptídeo e sete aminoácidos, de estrutura (Cys-Lys-Cys-Lys-Cys-Lys-Cys) ancorado na membrana celular de *Escherichia coli* W-1. O peptídeo foi responsável pela remoção de 96% do metilmercúrio (concentração de 12 μ M) no peixe *Carassius auratus*. A diminuição da concentração de metilmercúrio muscular foi vista enquanto houve o aumento da concentração de metilmercúrio nas fezes (LIU, 2019). Bae utilizou uma *Escherichia coli* modificada para produzir um peptídeo sintético EC20, de fórmula (Glu-Cys)₂₀ Gly, e obtiveram resultados interessantes no aumento da captura e bioacumulação do mercúrio inclusive de maneira seletiva (BAE, 2001).

As metalotioneínas, portanto, agem na diminuição da biodisponibilidade de mercúrio e podem ser utilizadas independentemente ou como mecanismo auxiliar com o operon *mer* na remoção de mercúrio em ambientes contaminados.

1.4 A BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES A MERCÚRIO

A (bio)prospecção consiste na avaliação, identificação e exploração sistemática da biodiversidade existente em determinado *habitat*, para fins comerciais ou de pesquisa. Tratando-se de microrganismos, envolve estratégias de estudo das frações cultiváveis e não-cultiváveis dos mesmos. Atualmente, é de grande interesse a pesquisa e seleção de microrganismos com características desejáveis e que

cresçam em meios de cultura específicos (EMBRAPA, 2015).

Uma forma de prospecção de microrganismos que produzem moléculas de interesse se dá através da procura ativa em lugares de alta pressão seletiva para as características desejadas, em que determinada molécula, gene, fármaco, marcador de interesse, confira alguma vantagem evolutiva naquele ambiente. Um exemplo é a procura de microrganismos resistentes a metais em áreas de alta contaminação: um microrganismo viável em local de tamanha pressão seletiva, pode facilmente ser resistente e possuir algum mecanismo de resistência a esse metal (ou múltiplos metais) (NAGUIB, 2019).

Por outro lado, imensa diversidade de microrganismos pode ser encontrada em locais e nichos ainda pouco explorados e podem ser fontes de moléculas e genes ainda não estudados ou conhecidos, mas com possível impacto positivo na qualidade de vida humana (SANTOS-GANDELMAN, 2014; BARKAY, 2005).

Neste contexto, foram estudados microrganismos coletados do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. O Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) está localizado na região equatorial do Oceano Atlântico (00°55'02"N; 29°20'42"W), pertencente ao estado de Pernambuco. Está distante cerca de 1000 km do litoral do Rio Grande do Norte e é formado por seis ilhas maiores, quatro ilhas menores e várias pontas de rocha. O solo é rochoso, sem a presença de praias. A temperatura média é de 27°C, com ínfima variação ao longo do ano. No primeiro semestre do ano chove de maneira abundante, enquanto o segundo semestre é praticamente seco (MARINHA DO BRASIL, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A bioprospecção de microrganismos, tanto em ambientes de pressão seletiva, quanto em ambientes isolados, pode trazer informações genéticas sobre a biodiversidade.

A busca por microrganismos resistentes e sensíveis a mercúrio faz parte da pesquisa básica na área de biologia molecular e genética, no entendimento de como crescem e se desenvolvem em ambientes extremos. De modo mais específico, a resistência a mercúrio – capacidade de transformar o mercúrio em formas menos tóxicas e de reduzir sua biodisponibilidade – pode encontrar espaço para aplicações na área de bioprocessos e biorremediação. Outro requisito para tal, é a seleção de microrganismos de rápido crescimento em meios contaminados.

Por mais que o ASPSP seja uma área preservada sem contaminação direta, a busca de microrganismos em locais poucos explorados, em ambientes salinos e aquáticos traz uma perspectiva de que esses organismos já estejam adaptados a esses locais, algo que provavelmente facilitaria uma futura aplicação biotecnológica nesses ambientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, identificar e caracterizar bactérias resistentes a mercúrio do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Selecionar microrganismos não-fastidiosos (de rápido crescimento) com crescimento em ambos caldos BHI (Brain-heart infusion) e LB (Luria-Bertani);
- b) Realizar varredura de microrganismos resistentes a 25 μM mercúrio em meio líquido;
- c) Selecionar microrganismos com maior capacidade de desenvolvimento em meios contendo concentrações de 10 μM a 50 μM de Hg^{2+} ;
- d) Identificar os microrganismos selecionados por sequenciamento de DNA ribossomal 16S;
- e) Realizar identificação molecular do gene *merA* nos isolados resistentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO (ASPSP)

Foram coletadas 17 amostras de incrustações (I) imersas em água, ao longo de sete pontos distintos do ASPSP. Foram denominadas, segundo o local de coleta da seguinte maneira: Lagoinha (Lag), Cratera (CR), Costa Leste A e B (CLA e CLB), Fenda na Costa Leste A e B (FCLA e FCLB), Coral (CO), Caldeirão A, B e C (CaA, CaB, CaC), Retenção A e B (RA e RB), Poço Verde (PV), Livres A e B (LA e LB). As siglas entre parênteses representam as denominações dos isolados descritos no trabalho.

Foram isolados fungos leveduriformes e bactérias dessas amostras através do cultivo em quatro meios de cultura distintos: BHI (*Brain-Heart Infusion* – Infusão Cérebro-Coração), BDA (Ágar Batata-Dextrose), Sabouraud e Dicloran Rosa Bengala.

O caldo BHI (pH 7,4) é composto por peptona de gelatina 10 g/L, infusão de coração de porco 10 g/L, infusão de cérebro de porco 7,5 g/L, cloreto de sódio 5,0 g/L, fosfato dipotássico 2,5 g/L e dextrose 2,0 g/L. É um meio rico para microrganismos de crescimento lento, incluindo bactérias aeróbicas, anaeróbicas, fungos e leveduras.

O BDA (pH 5,6) é rico em açúcares simples, composto por 20 g/L de dextrose e 6,5 g/L de infusão de batata sendo ideal para crescimento de ampla variedade de microrganismos.

O meio Sabouraud (pH 5,6) é composto por 20,0 g/L de dextrose e mistura de digestivo péptico de tecido animal e digestivo pancreático de caseína 10 g/L. É um meio para crescimento de leveduras, fungos filamentosos. O pH levemente ácido e a elevada concentração de dextrose pode ser seletiva para fungos estáveis por osmose.

Dicloran Rosa Bengala (pH 5,6) é composto por 10,0 g/L de glicose, 15,0 g/L de ágar bacteriológico, 0,1 g/L de cloranfenicol, 1,0 g/L de fosfato de monopotássio, 0,025 g/L de rosa bengala, 0,002 g/L de dicloran, 5,0 g/L de digestão enzimática de

plantas e tecido animal e 0,5 g/L de sulfato de magnésio monohidratado. É um meio seletivo para espécies de fungos de crescimento lento. Dicloran é utilizado para reduzir o crescimento de fungos de rápida propagação, a rosa bengala inibe o crescimento bacteriano e age na diminuição do tamanho das colônias de fungos de rápido crescimento.

Após o crescimento e isolamento dos microrganismos das amostras, foram realizados repiques em meio sólido. Depois, os microrganismos foram estocados com glicerol 50% em duplicatas armazenadas em -20°C e em -80°C.

4.2 ENSAIO DE CRESCIMENTO CELULAR EM MEIO LÍQUIDO NA PRESENÇA DE MERCÚRIO

Nesta etapa, foram selecionadas bactérias capazes de crescer em 1,5 mL de caldo BHI e em 1,5 mL de caldo LB (Luria-Bertani) a 25°C em pelo menos 48 h por análise visual da turbidez do meio de cultura, com intuito de evitar a utilização de microrganismos fastidiosos. Os isolados escolhidos passaram para o ensaio de crescimento celular em meio líquido na presença de mercúrio.

O ensaio é iniciado com o pré-inóculo de 12 microrganismos em dois diferentes caldos: BHI e LB. O caldo BHI é descrito na seção 4.1, enquanto o caldo LB (pH 7,0) é composto por: 10,0 g/L de triptona, 5,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de cloreto de sódio. É utilizado para procedimentos de rotina e para microrganismos pouco exigentes. Os dois caldos distintos foram utilizados para medir a diferença de crescimento diante de diferente disponibilidade de nutrientes.

O pré-inóculo foi feito através da adição de 4 mL de caldo em tubos de falcon de 15 mL e utilização de alças descartáveis estéreis para inóculo dos microrganismos. Os tubos permaneceram em agitador por 24 h a 25°C e 120 RPM.

As células foram lavadas com solução de NaCl 0,9%, após centrifugação de 1,5 mL em microtubos de 2 mL, a 9000 RPM por 5 minutos e descarte do sobrenadante. Neste ponto, foi realizada medição de densidade ótica a 600 nm (OD 600) utilizando placa de 96 poços. A absorvância da amostra foi medida em espectrofotômetro para placas SpectraMax i3.

Foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições descritas

anteriormente, sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com novo caldo LB ou BHI ou caldo LB ou BHI com HgCl_2 25 μM , de acordo com o volume necessário para que a OD 600 atingisse 0,33, escolhida para avaliar o crescimento celular.

A solução de HgCl_2 utilizada foi preparada a partir de uma solução de estoque de 1 g/L de HgCl_2 . A solução de estoque de HgCl_2 foi preparada através da pesagem em balança analítica e dissolução com água Milli-Q. A partir da solução de estoque, uma alíquota foi utilizada para preparo de uma solução de HgCl_2 1,5 mM, que foi esterilizada utilizando filtro de 0,20 μM . Os caldos com HgCl_2 25 μM foram feitos a partir da pipetagem da solução estéril em caldo. Toda manipulação de bactérias e materiais estéreis foi realizada dentro de capela de fluxo laminar

Como controle positivo de resistência a mercúrio, foi utilizada *Serratia sp* em todos os experimentos deste trabalho, capaz de resistir a até 69 μM de Hg^{2+} ou 12 ppm (MAHBUB, 2016; SINGH, 2021). Como controles negativos foram utilizados os caldos LB e BHI e os caldos LB e BHI com HgCl_2 25 μM . O controle positivo de crescimento foi o crescimento dos isolados em meio LB e BHI. Cada condição foi realizada em triplicata.

Foi pipetado um volume de 150 μL em cada poço de placa de 96 poços e foi realizada medida de OD 600. A OD 600 foi utilizada novamente para avaliação do crescimento bacteriano no final do experimento, após 72 horas de exposição.

A partir do resultado de crescimento bacteriano pelo experimento descrito, foram selecionados isolados para o teste de sensibilidade em gota baseado em CFU, para avaliação da viabilidade celular e crescimento em meio sólido em concentrações de até 50 μM de HgCl_2 .

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE EM GOTA BASEADO EM CFU FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO

O teste de sensibilidade em gota foi realizado em microrganismos previamente selecionados pelo experimento descrito anteriormente. A primeira etapa do teste é o preparo do pré-inóculo em meio LB, conforme descrito na seção 4.2. Após o preparo do pré-inóculo, o conteúdo foi centrifugado, foi descartado o

sobrenadante, foi adicionada solução de NaCl 0,9%, nova etapa de centrifugação e as amostras foram ressuspensas em nova solução de NaCl 0,9% estéril. As condições de centrifugação são as mesmas descritas na seção 4.2. Foi adicionado o volume de NaCl 0,9% necessário para atingir OD 600 inicial de 0,8, utilizada para avaliar a tolerância e crescimento em meio sólido.

Diluições seriadas de 1:10 com solução de NaCl 0,9% estéril foram realizadas a partir da OD 600 inicial de 0,8 ajustada com auxílio de espectrofotômetro. No teste piloto, as diluições foram até a ordem de 10^{-5} , enquanto que nos testes 1 e 2, as diluições foram até a ordem de 10^{-7} . Além das bactérias candidatas a resistência a mercúrio, foi utilizada *Serratia sp* como controle positivo de crescimento em todas as condições estudadas. O teste piloto consistiu apenas na avaliação visual de crescimento em meio ágar-LB nas placas de meio LB contendo HgCl_2 nas mesmas condições descritas a seguir.

Para os testes de sensibilidade (1 e 2), foram feitas placas de meio ágar-LB e ágar-LB com água do mar. A água do mar foi coletada na Praia da Guarita, na cidade de Torres – RS, a fim de mimetizar o crescimento marinho em alta concentração salina e na presença de outros possíveis fatores que podem estar envolvidos no crescimento e desenvolvimento bacteriano no mar, como a presença de outros metabólitos e outros sais, por exemplo. Foram feitas placas de meio ágar-LB e ágar-LB com água do mar nas seguintes concentrações de HgCl_2 : 10 μM , 25 μM e 50 μM . Produzidas a partir da adição de quantidade adequada de solução de 1,5 mM de HgCl_2 no meio, antes das placas serem vertidas.

O experimento consistiu na pipetagem de 3 μL do concentrado de OD 600 = 0,8 e das diluições de 10^{-3} a 10^{-7} nas placas de meio ágar-LB e ágar-LB em água do mar.

O crescimento bacteriano foi avaliado através do logaritmo na base 10 da contagem de unidades formadoras de colônia por mL (log CFU/mL) após 24 h de crescimento em temperatura de 25°C. A contagem foi realizada sempre na condição mais diluída em que houve crescimento celular e foi utilizada lupa acoplada ao computador para facilitar a contagem de células.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PELO GENE DA SUBUNIDADE DE RNA RIBOSSOMAL 16S DE CANDIDATOS RESISTENTES

Foi extraído DNA de sete bactérias escolhidas e utilizadas no experimento anterior. O DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio e a composição do tampão de lise utilizado foi: (NaCl 200mM, Tris-HCl 10mM (pH 7,5), SDS 1%, Triton X-100 2%, EDTA 1mM). Foi avaliada a qualidade do DNA em eletroforese em gel de agarose 0,8% e também quantificado em espectrofotômetro NanoDrop.

A seguinte etapa consistiu na reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers 27F e 1492R para o gene do RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) com a enzima Platinum SuperFi DNA polimerase. O volume total da reação foi de 25 µL. O programa de temperatura do termociclador incluiu: etapa de pré-desnaturação a 98°C por 2 min; 33 ciclos de 98°C por 30 s, 58°C por 30 s, uma etapa de extensão a 72°C por 1 min e o fim da extensão a 72 °C por 5 min. A amplificação foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 0,8% e o fragmento resultante foi purificado.

A purificação do fragmento próximo a 1500 pb foi realizada através de kit PureLink Invitrogen para purificação de fragmento em gel de agarose. O produto de purificação foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop e enviado para sequenciamento com os mesmos primers 27F e 1492R.

4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GENE CODIFICADOR DA ENZIMA MERCÚRIO REDUTASE NOS ISOLADOS RESISTENTES

De maneira análoga ao procedimento anterior, foi realizada PCR com o DNA extraído utilizando o par de primers F – 5' TCGTGATGTTTCGACCGCT 3' e R – 5' TACTCCCGCCGTTTCCAAT 3' (SOTERO-MARTINS, 2008) para região conservada do gene *merA* e a enzima Platinum SuperFi DNA polimerase. O volume total da reação foi de 25 µL. O programa de temperatura do termociclador incluiu: etapa de pré-desnaturação a 94°C por 2 min; 33 ciclos de 55°C por 1 min, 72°C por 30 s, uma etapa de extensão a 72°C por 30 s e o fim da extensão a 72°C por 5 min. O fragmento amplificado possui tamanho esperado de 431 pb (adaptado de SOTERO-MARTINS, 2008).

Resultados positivos para presença do operon *mer* tiveram fragmento

purificado através do kit PureLink Invitrogen para purificação de fragmento em gel de agarose. O produto de purificação foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop e enviado para sequenciamento com mesmos primers da PCR. O sequenciamento em ambos os casos foi realizado pela ACTGene – Análises Moleculares (Centro de Biotecnologia, UFRGS) em um sequenciador AS 3500xl Genetic Analyzer – Applied Biosystems.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO ARQUIPÉLAGO DE SÃO PEDRO E SÃO PAULO (ASPSP)

No total, foram isoladas 275 bactérias ou leveduras das amostras de incrustações nos 17 pontos de coleta, crescidas a 25 °C e/ou 37 °C, conforme descrito no item 4.1. As condições de coletas variaram conforme a Tabela 3:

Tabela 2: Condições de coleta das amostras do ASPSP

| Parâmetro | Condição de coleta |
|-------------|---------------------|
| Temperatura | 25,8 °C – 29,3 °C |
| pH | 7,45 – 7,90 |
| Salinidade | 21,7 g/L – 38,0 g/L |

Os microrganismos obtidos cresceram em, pelo menos, uma das placas de meios de cultura BHI, BDA, Sabouraud e Dicloran Rosa Bengala. O crescimento em meio BHI possibilitou o melhor crescimento bacteriano entre os quatro meios de cultura apresentados.

O meio BHI é ótima fonte de carboidratos, nitrogênio, fósforo e vitaminas para microrganismos no geral, enquanto os outros meios possuíam algum grau de restrição quanto ao crescimento bacteriano. Posteriormente, o meio BHI foi utilizado para manutenção das bactérias isoladas.

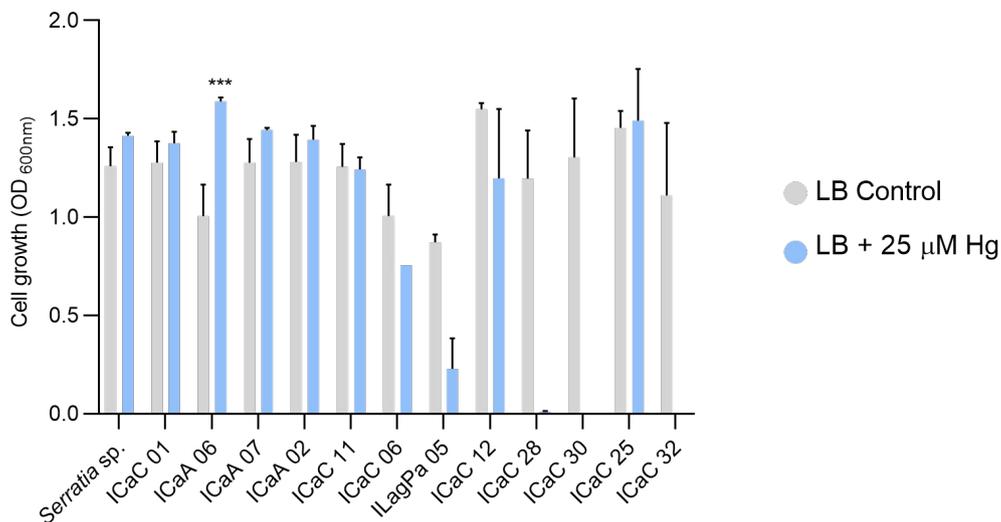
5.2 ENSAIO DE CRESCIMENTO CELULAR EM MEIO LÍQUIDO NA PRESENÇA DE MERCÚRIO

O crescimento bacteriano foi avaliado após 72 h de exposição ao mercúrio por medida de OD 600. A Figura 2 e a Figura 3, respectivamente, mostram os resultados de ensaio de crescimento celular nos meios líquidos LB e BHI na presença de 25 µM de cloreto de mercúrio. A Figura 4 compara o crescimento em meio líquido LB com o crescimento em BHI de cada isolado. Os resultados das triplicatas biológicas foram comparadas segundo análise de variância (ANOVA) com dois fatores, utilizando o software GraphPad.

O objetivo do ensaio em meio líquido na presença de mercúrio era fazer uma varredura de possíveis candidatos a resistência a mercúrio, ou seja, testar a maior quantidade de microrganismos possível de maneira satisfatória e conclusiva.

Serratia sp foi utilizada nos experimentos como parâmetro para avaliação de crescimento dos isolados em todas as condições estudadas, uma vez que é resistente a 69 μM de Hg^{2+} ou 12 ppm, conforme descrito na seção 4.1.

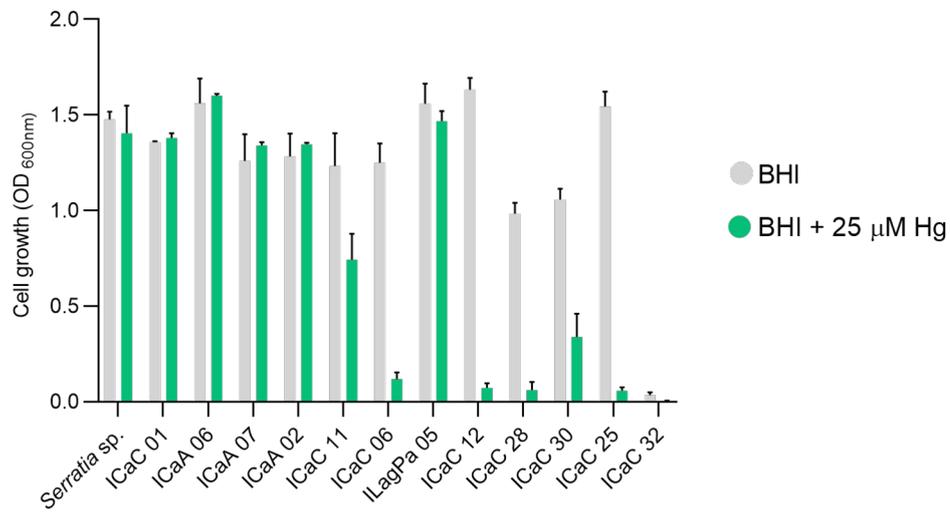
Figura 2: Ensaio de crescimento microbiano 72 horas dos isolados em meio LB líquido e na presença de cloreto de mercúrio.



Legenda: cinza: controle de crescimento bacteriano em meio LB; azul: crescimento em LB na presença de 25 μM HgCl_2 . *** crescimento significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação ao controle de crescimento ($n = 3$).

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

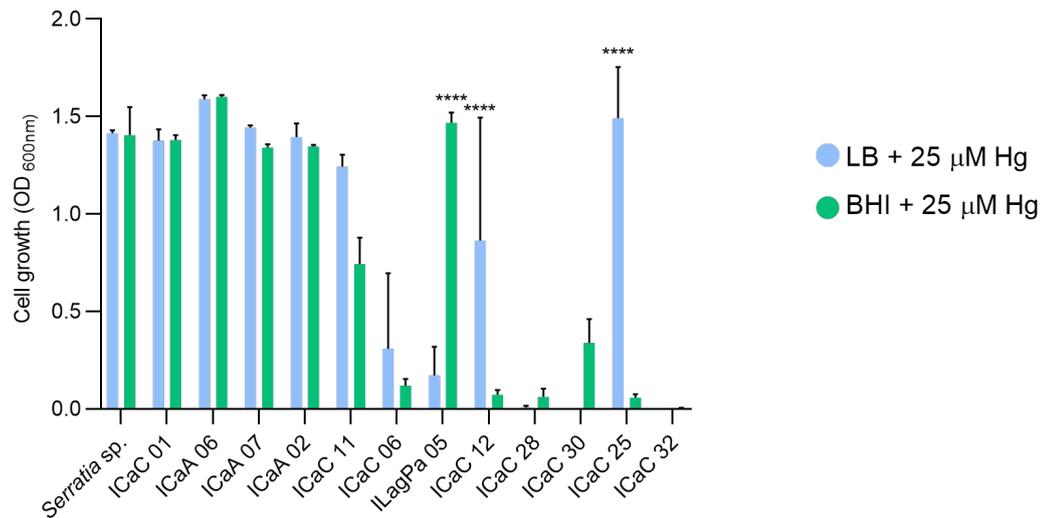
Figura 3: Ensaio de crescimento microbiano em 72 horas dos isolados em meio BHI líquido e na presença de cloreto de mercúrio.



Legenda: cinza: controle de crescimento bacteriano em meio BHI; verde: crescimento em BHI na presença de 25 µM HgCl₂. (n = 3).

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Figura 4: Crescimento comparativo dos isolados em meio líquido LB e BHI na presença de cloreto de mercúrio após 72 horas de exposição.



Legenda: azul: crescimento em meio LB na presença de 25 µM HgCl₂; verde: crescimento em BHI na presença de 25 µM HgCl₂; **** crescimento significativamente maior ($p < 0,05$) de um isolado em determinado meio líquido em relação ao outro. (n = 3)

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

A Figura 4 mostra que houve diferença mínima de crescimento em caldo LB em comparação com o crescimento em caldo BHI. ILagPa05 teve menor crescimento em LB, enquanto ICaC12 e ICaC25 tiveram crescimento melhor desenvolvido em meio LB em comparação ao BHI. Os resultados mostram que, de modo geral, os diferentes meios de cultivo pouco impactaram em 72 horas de experimento e não foram suficientes para mostrar diferença significativa no crescimento nas condições estabelecidas.

A Tabela 3 mostra isolados que tiveram bom crescimento e que foram selecionados a partir do experimento de crescimento em LB e BHI na presença 25 µM de HgCl₂, porém após 24 horas do início do experimento. Esses resultados em 24 horas decorrem de uma limitação experimental ocorrida com a avaliação da densidade ótica. Inicialmente a proposta era acompanhar o crescimento em 24 h, 48

h e 72 h. Contudo algumas placas sofreram contaminações no processo de reposicionamento no agitador e, portanto, não foi possível avaliar o crescimento em 48 h e 72 h após o início do experimento.

Tabela 3: Crescimento celular em meio líquido LB e BHI na presença de 25 µM de cloreto de mercúrio de microrganismos selecionados em 24 horas de crescimento

** Crescimento maior em BHI ($p < 0,05$) em relação ao crescimento em LB do mesmo isolado; *** Crescimento maior em BHI ($p < 0,01$) em relação ao crescimento em LB do mesmo isolado ($n = 3$).

| Isolado | Controle LB | LB 25 µM de HgCl ₂ | Controle BHI | BHI 25 µM de HgCl ₂ |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------------|
| <i>Serratia sp.</i> | 1,430 (± 0,004) | 1,551 (± 0,007) | 1,487 (± 0,075) | 1,676** (± 0,056) |
| ICaB07 | 1,203 (± 0,011) | 1,451 (± 0,042) | 1,285 (± 0,035) | 1,425 (± 0,060) |
| ICLFA16 | 1,766 (± 0,010) | 0,355 (± 0,068) | 1,728 (± 0,025) | 1,743*** (± 0,060) |
| IRB15 | 1,423 (± 0,025) | 1,569 (± 0,051) | 1,186 (± 0,010) | 1,301 (± 0,037) |

Os isolados ICaA06, ICaA07, ICaA02, ICaC01 e ICaC11 foram selecionados nessa rodada de testes por crescerem tanto na condição controle quanto na condição de exposição a 25 µM de HgCl₂, tanto em meio BHI quanto em meio LB, com menor disponibilidade de nutrientes que BHI. Tomando como base a OD 600 inicial de 0,33, é possível observar nas Figuras 2 e 3, que os microrganismos restantes não tiveram aumento significativo ($p < 0,05$) no valor de OD 600 diante dos controles de crescimento e diante do controle positivo *Serratia sp.* As triplicatas biológicas foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA) com dois fatores, utilizando o software GraphPad.

A lista completa de isolados selecionados ou não selecionados para o teste seguinte de sensibilidade está na Tabela 4. Microrganismos selecionados mostraram crescimento em relação aos controles de crescimento e controle positivo na condição de 25 µM de HgCl₂ em ambos meios de cultura, enquanto os não-selecionados não tiveram o mesmo desempenho.

Tabela 4: Microrganismos utilizados no ensaio de crescimento celular em meio líquido com mercúrio. As siglas representam o local de coleta dos isolados, conforme consta na seção 4.1.

| Selecionados | Não-selecionados |
|---|--|
| ICaA01, ICaA02, ICaA06, ICaA07, ICaB07, ICaC11, ICLFA16, IRB15, | IRA02, IRA15, IRA18, IRA25, IRA26, IRA27, IRA03, IRA20, IRA28, IRA03, IRA16, IRA34, IRA24, ICaB03, ICaB05, ICaB02, ICaB06, ILA05, ICLFA07, ICLFA13, ICLFA16, ILA05, IRB21, IRB15, ILagPa05, ICaC06, ICaC12, ICaC28, ICaC30, ICaC25, ICaC32 |

Dos 39 microrganismos testados, foram selecionados os oito microrganismos da coluna da esquerda na Tabela 4, a partir do ensaio de varredura em meio líquido.

Partindo do objetivo do trabalho, que é o de explorar e buscar aplicações para os microrganismos selecionados, foram excluídos microrganismos fastidiosos e todos que não cresceram ou apresentaram baixo crescimento em 25 μM de HgCl_2 em ambos meios de cultura líquidos.

Consequentemente, foram selecionados apenas os que demonstraram potencial de crescimento em todas as condições experimentais. Baixo crescimento, neste trabalho, foi caracterizado empiricamente como $\text{OD } 600 < 0,700$, sendo que todos os controles de crescimento (com exceção de ICaC32 em meio BHI) cresceram no mínimo até $\text{OD } 600 = 1,000$. Esse experimento foi importante para trazer um panorama acerca dos microrganismos do ASPSP, quanto a seu crescimento nos meios de cultura selecionados e em HgCl_2 .

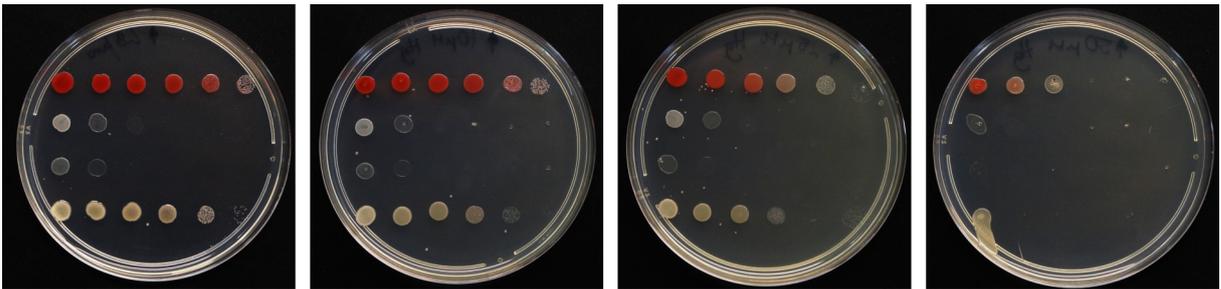
Uma vez que este trabalho é de caráter exploratório, optou-se por investigar uma concentração de Hg^{2+} em um tempo de 72 horas de exposição. Além dessas limitações, um ponto de atenção que deve ser mencionado é a facilidade de contaminação entre as amostras, mesmo que todos os cuidados com o protocolo sejam tomados.

5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE EM GOTA BASEADO EM CFU FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO

Inicialmente foram testados três isolados resistentes a 25 μM de HgCl_2 nas condições experimentais mostradas na seção 4.2 como teste piloto. Os três isolados

foram testados em diluições seriadas, partindo do concentrado com OD = 0,8 até diluições de 10^{-5} , em meio ágar-LB, escolhido por ser um meio simples e comum, sem beneficiar isolados de lento crescimento. A Figura 5 mostra o experimento em que cada linha representa uma bactéria e cada coluna representa uma diluição seriada.

Figura 5: Teste piloto de sensibilidade em gota



Legenda: de cima para baixo: *Serratia* sp , ICLFA16, IRB15, ICaB07, da esquerda para direita: diluições seriadas até 10^{-5} . Placas (da esquerda para direita): 0 μM (controle de crescimento), 10 μM , 25 μM e 50 μM de HgCl_2 respectivamente.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

O teste de sensibilidade piloto avaliou qualitativamente o crescimento de cada microrganismo na condição controle e em diferentes concentrações de HgCl_2 . Os isolados ICLFA16 e IRB15 apresentaram baixa taxa de crescimento, uma vez que não conseguiram crescer em diluições a partir de 10^{-3} em qualquer condição estudada. O isolado IRB15 concentrado (OD 600 = 0,8) não é resistente a concentração de 50 μM de HgCl_2 . O isolado ICaB07 teve taxa de crescimento menor que o de *Serratia* sp em todas as condições, porém é resistente em todas as concentrações de mercúrio testadas, sendo resistente a 50 μM de HgCl_2 apenas na forma de concentrado (sem diluição). *Serratia* sp, contudo, é resistente até diluições na ordem de 100x (diluição 10^{-2}). Por ICaB07 mostrar uma taxa de crescimento adequada em todas as concentrações e muito superior aos demais isolados, ele foi utilizado nos testes seguintes. Os isolados ICLFA16 e IRB15 não foram mais utilizados neste trabalho.

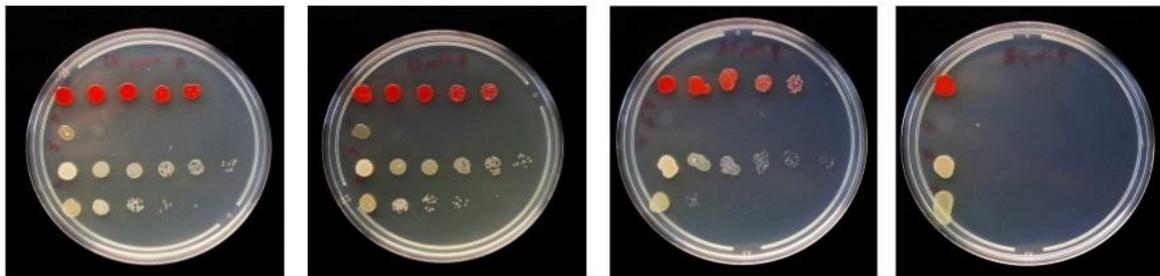
O isolado ICaB07 foi testado novamente junto com os cinco isolados

restantes. No ensaio seguinte, os isolados foram testados também em concentrações de mercúrio para avaliar a influência da água do mar no crescimento em meio ágar-LB, e foi realizada contagem de CFU.

O Teste 1 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB (Figura 6 e Figura 7) e ágar-LB em água do mar (Figura 8 e Figura 9) englobou os seguintes isolados: ICaA06, ICaB07 e ICaC11. *Serratia* sp foi utilizada como controle positivo em todas as condições de todos os testes de sensibilidade.

A Figura 6 mostra os resultados do Teste 1 em meio ágar-LB. Análise visual mostra que houve crescimento de *Serratia* sp, ICaB07 e ICaC11 na condição de 50 μ M de HgCl_2 no concentrado de OD 600 = 0,8. Não foi possível realizar contagem de CFU nessa condição devida a quantidade elevada de células na maior concentração e ausência nas concentrações mais baixas.

Figura 6: Teste 1 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB:



Legenda: de cima para baixo: *Serratia* sp, ICaA06, ICaB07, ICaC11, da esquerda para direita: diluições seriadas de 10^0 , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Placas (da esquerda para direita): 0 μ M (controle de crescimento), 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M de HgCl_2 respectivamente.

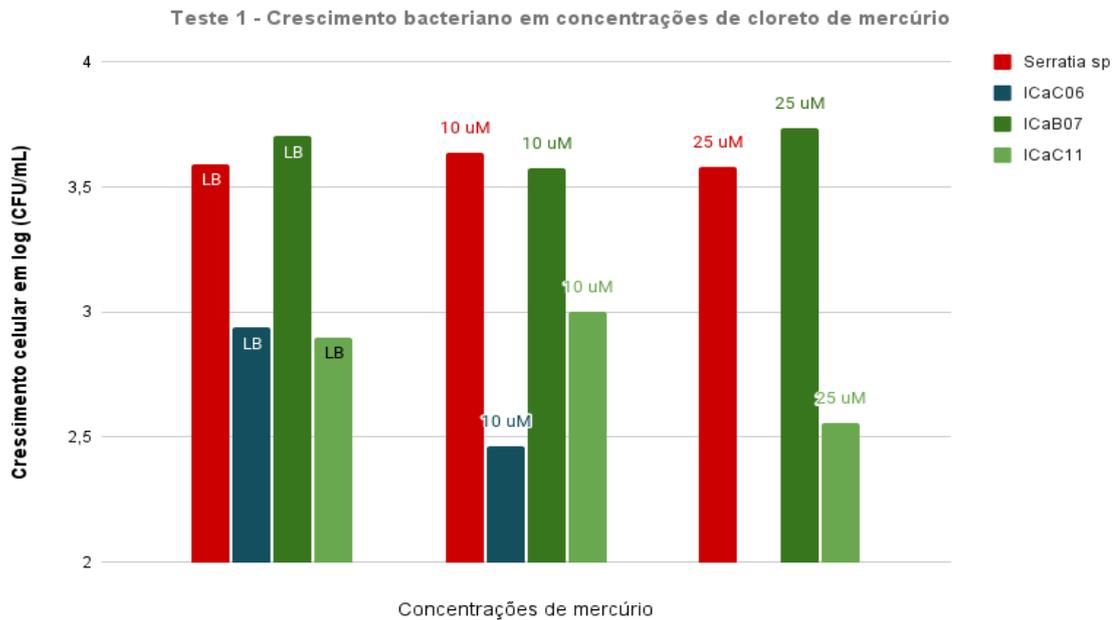
Fonte: elaborado pelo autor

A partir dos resultados do Teste 1, é possível perceber o comportamento da *Serratia* sp neste e em todos os testes de sensibilidade. O pigmento avermelhado característico aparece quando se desenvolve em temperaturas próximas a 25 °C, entretanto, é possível notar sua descoloração, muito provavelmente devido ao estresse celular, seguido de morte celular causado pelo aumento da concentração

de mercúrio. Ao longo dos experimentos também é possível visualizar a diminuição no tamanho das colônias de todos os microrganismos com o aumento da concentração de mercúrio e na presença de altas concentrações salinas, conforme apresentado na Figura 8 e Figura 12.

A Figura 7 mostra o gráfico de crescimento bacteriano em meio ágar-LB na escala de log CFU/mL, dos mesmos isolados ICaA06, ICaB07 e ICa11, com *Serratia* sp como controle.

Figura 7: Contagem de CFU do teste 1 de sensibilidade em meio ágar-LB



Legenda: crescimento bacteriano em log (CFU/mL) x concentrações de mercúrio. Vermelho: *Serratia* sp.; azul: ICaC06; verde-escuro: ICaB07; verde-claro: ICaC11. Não houve crescimento de ICaA06 na concentração de 25 μ M de HgCl₂ ou maior.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

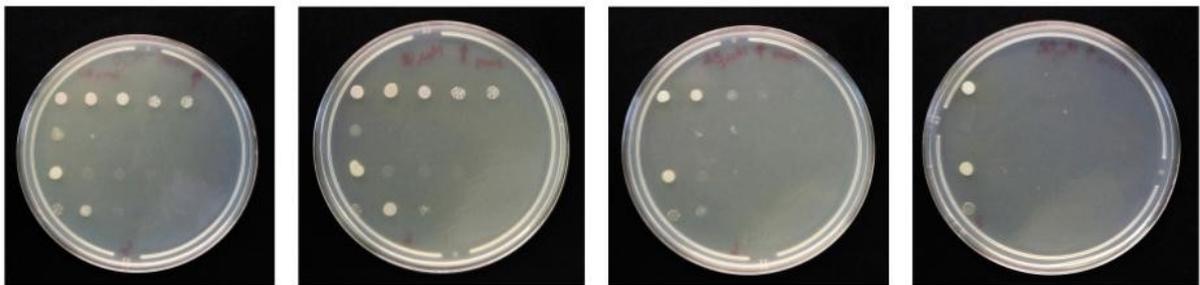
Neste teste, o crescimento de ICaB07 foi igual ao da *Serratia* sp em todas as condições propostas, caracterizando-a como bactéria resistente. ICaC11 teve crescimento mais de dez vezes menor se comparado ao crescimento de ICaB07 e *Serratia* sp, mas se mostrou tolerante em todas as condições. Ambas podem ser estudadas para aplicações biotecnológicas envolvendo resistência ao mercúrio. ICaC06 teve seu crescimento drasticamente reduzido com o aumento da

concentração de mercúrio e não foi resistente à concentração de 25 μM de HgCl_2 ou mais.

Não foi realizada contagem de CFU para a concentração de 50 μM de HgCl_2 em nenhuma condição nos Testes 1 e 2, pois embora tenha havido crescimento na condição sem diluição (OD 600 = 0,8), na primeira diluição de 10^{-3} não houve crescimento.

A Figura 8 mostra os resultados do Teste 1 em meio ágar-LB com água do mar. Os efeitos da água do mar são claros ao comparar a Figura 8 com a Figura 6 e envolvem: opacidade do meio de cultura, espalhamento de colônias reduzido e descoloração das colônias, podendo indicar estresse celular.

Figura 8: Resultado do Teste 1 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB em água do mar



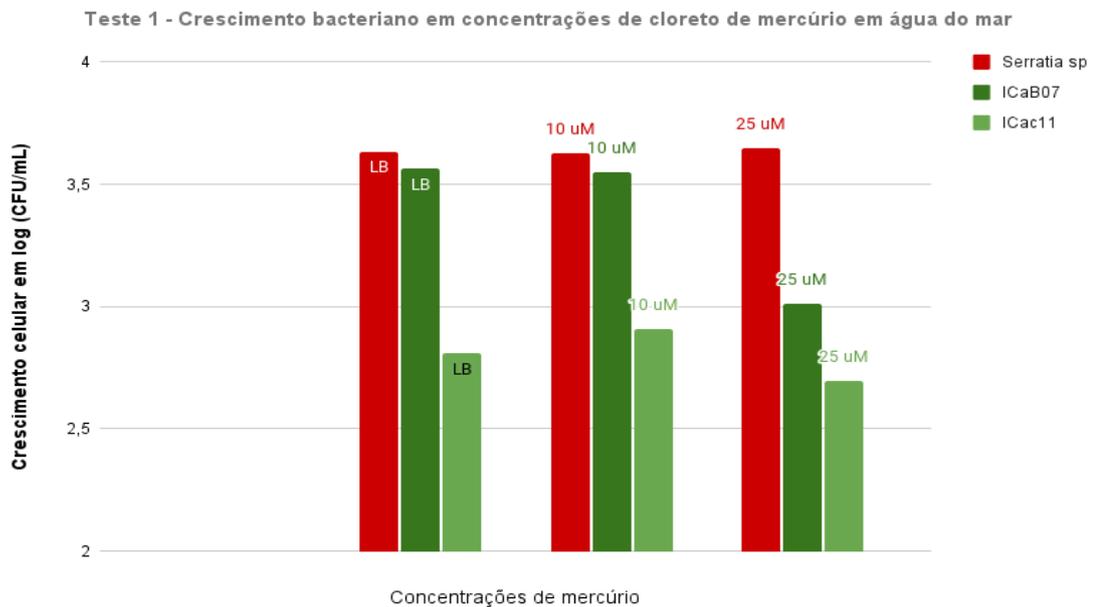
Legenda: linhas (de cima para baixo): *Serratia* sp (controle positivo), ICaA06, ICaB07, ICaC11, colunas (da esquerda para direita): diluições seriadas de 10^0 , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Placas (da esquerda para direita): 0 μM (controle de crescimento), 10 μM , 25 μM e 50 μM de HgCl_2 respectivamente.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Houve crescimento de ICaA06 apenas no concentrado, na condição controle e de 10 μM , mostrando sua incapacidade de crescimento em meios muito salinos. Não foi possível realizar contagem de CFU devido ao crescimento excessivo no concentrado e não-crescimento nas demais diluições.

A Figura 9 mostra o gráfico de crescimento bacteriano em meio ágar-LB com água do mar na escala de log CFU/mL, dos mesmos isolados ICaA06, ICaB07 e ICa11, com *Serratia* sp como controle.

Figura 9: Teste 1 de sensibilidade em gota baseado em CFU em água do mar



Legenda: crescimento bacteriano em log (CFU/mL) x concentrações de mercúrio. Vermelho: *Serratia sp.*; verde-escuro: ICaB07; verde-claro: ICaC11.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

O crescimento de ICaB07 diminuiu na condição de 25 μ M em comparação com o meio ágar-LB, mas ainda apresentou resultados de resistência a mercúrio. ICaC11 apresentou diminuição no crescimento em relação a ICaB07 e *Serratia sp.*, porém apresentou crescimento constante nas diferentes concentrações, mostrando-se resistente. ICaA06 não cresceu em nenhuma condição nos ensaios em água do mar.

Figura 10: Teste 2 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB



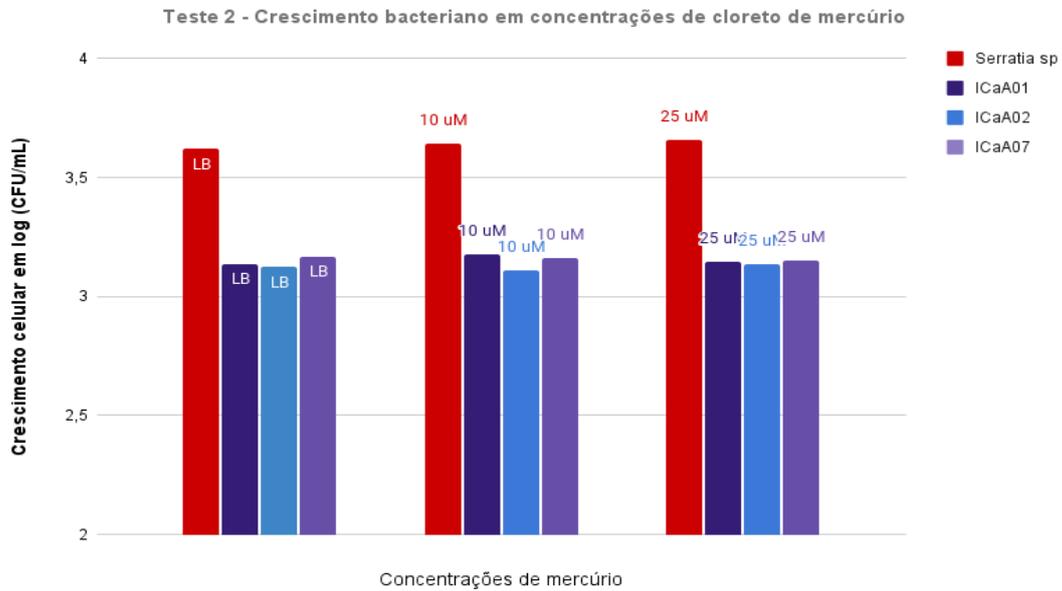
Legenda: linhas (de cima para baixo): *Serratia* sp (controle positivo), ICaA01, ICaA02, ICaA07, colunas (da esquerda para direita): diluições seriadas de 10^0 , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Placas (da esquerda para direita): 0 μM (controle de crescimento), 10 μM , 25 μM e 50 μM de HgCl_2 respectivamente.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

É possível verificar que os três isolados mantiveram um padrão de crescimento entre si, com o aumento da concentração de mercúrio. Todos os isolados tiveram crescimento apenas na maior concentração de células, na placa de 50 μM de HgCl_2 , não sendo possível realizar contagem de CFU. Para tal, seria necessária uma diluição intermediária

O gráfico com os resultados da contagem de CFU, na Figura 11, mostra de maneira quantitativa o crescimento dos isolados. ICaA01, ICaA02 e ICaA07 são resistentes frente ao mercúrio, tanto quanto o controle positivo *Serratia* sp nas condições estabelecidas neste trabalho. Mesmo com menor taxa de crescimento celular, é observada uma reprodutibilidade nos resultados apresentados.

Figura 11: Resultados do Teste 2 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB

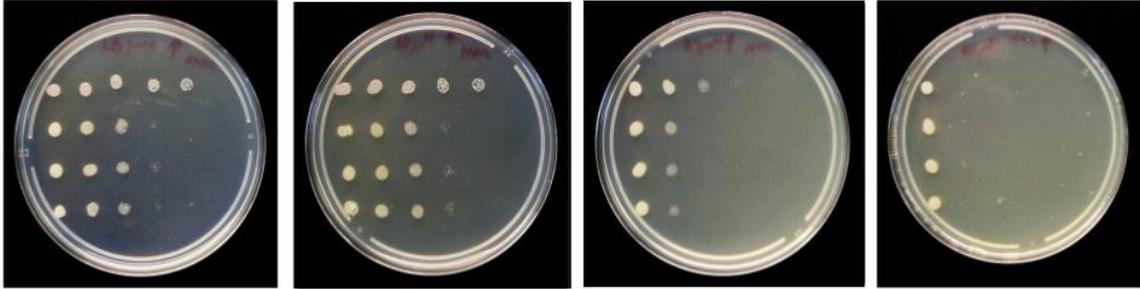


Legenda: crescimento bacteriano em log (CFU/mL) x concentrações de mercúrio. Vermelho: *Serratia sp.*; azul-escuro: ICaA01; azul-claro: ICaA02; violeta: ICaA07.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

A Figura 12 mostra os resultados do Teste 2 em meio ágar-LB com água do mar. Os efeitos da água do mar mostram o mesmo comportamento com relação à diminuição de crescimento na presença de um meio salino, conforme discussão sobre a Figura 8.

Figura 12: Teste 2 de sensibilidade em gota baseado em CFU com meio ágar-LB em água do mar

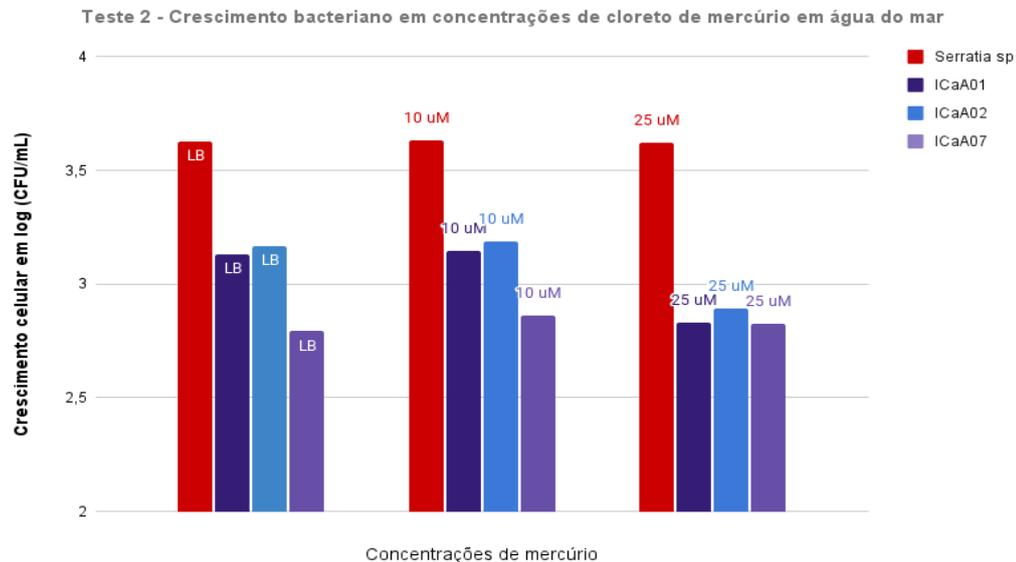


Legenda: linhas (de cima para baixo): *Serratia* sp (controle positivo), ICaA01, ICaA02, ICaA07, colunas (da esquerda para direita): diluições seriadas de 10^0 , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Placas (da esquerda para direita): 0 μM (controle de crescimento), 10 μM , 25 μM e 50 μM de HgCl_2 respectivamente.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

De maneira similar ao Teste 2 em ágar-LB com os isolados ICaA01, ICaA02 e ICaA07, e em ágar-LB com água do mar, o controle positivo obtido com a *Serratia* sp mostrou reprodutibilidade em todas as condições de diluição e concentração de Hg. Neste estudo, os isolados ICaA01, ICaA02 e ICaA07 mostram resistência em todas as concentrações apresentadas. ICaA01 e ICaA02 apresentaram diminuição no crescimento em 25 μM de HgCl_2 em combinação com a alta salinidade do meio, conforme é mostrado na Figura 13.

Figura 13: Teste 2 de sensibilidade em gota baseado em CFU em ágar-LB com água do mar



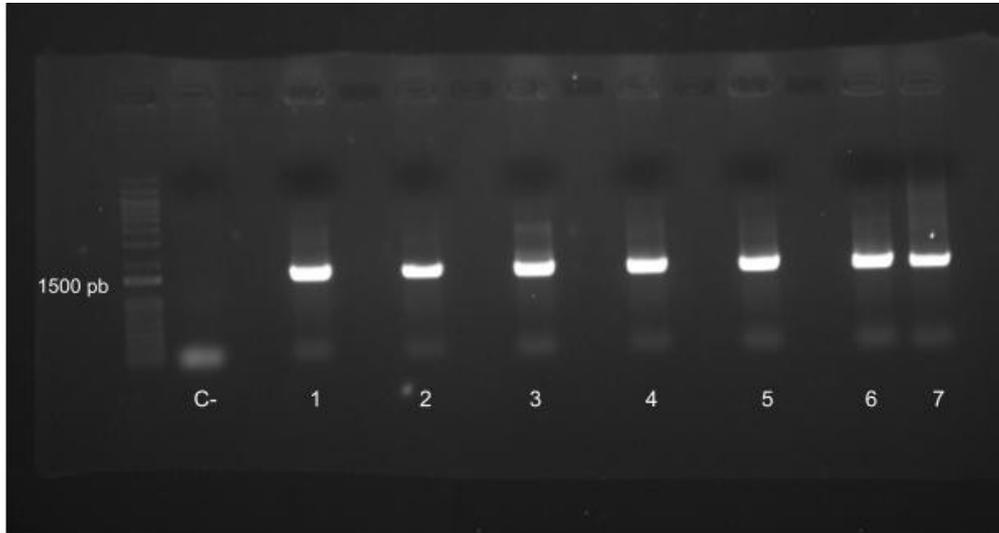
Legenda: crescimento bacteriano em log (CFU/mL) x concentrações de mercúrio. Vermelho: *Serratia sp.*; azul-escuro: ICaA01; azul-claro: ICaA02; violeta: ICaA07.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PELO GENE DA SUBUNIDADE DE RNA RIBOSSOMAL 16S DE CANDIDATOS RESISTENTES

A partir da extração de DNA, a PCR para o gene rRNA 16S foi realizada e analisada em eletroforese em gel de agarose 0,8% para incisão e purificação do fragmento de tamanho próximo a 1500 pb, correspondente à banda do gene rRNA 16S amplificado, conforme a Figura 14.

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da PCR do gene rRNA 16S dos isolados resistentes



Legenda: controle negativo (sem DNA); 1: ICaA01; 2: ICaA06; 3: ICaC11; 4: ICaA07; 5: ICaA02; 6: ICaB07; 7: ICaB07 (isolado de um experimento). Todos possuem o gene rRNA 16S amplificado, representado pelo fragmento de cerca de 1500 pb.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Os resultados de sequenciamento usando PCR para o gene rRNA 16S mostraram a presença do gênero *Aeromonas* sp ou *Oceanimonas* sp para cinco dois seis isolados investigados neste estudo. O isolado ICaA06, contudo, teve *Sporosarcina* sp como gênero encontrado, diferindo dos demais, conforme aparece na Tabela 5:

Tabela 5: Potenciais gêneros bacterianos dos isolados resistentes

| Isolados | Gênero |
|----------|---|
| ICaB07 | <i>Aeromonas</i> sp, <i>Oceanimonas</i> sp. |
| ICaA02 | <i>Aeromonas</i> sp, <i>Oceanimonas</i> sp. |
| ICac11 | <i>Aeromonas</i> sp, <i>Oceanimonas</i> sp. |
| ICaA01 | <i>Aeromonas</i> sp, <i>Oceanimonas</i> sp. |
| ICaA07 | <i>Aeromonas</i> sp, <i>Oceanimonas</i> sp. |
| IcaA06 | <i>Sporosarcina</i> sp. |

A semelhança entre os gêneros pode explicar o comportamento similar frente

a resistência ao mercúrio inorgânico, uma vez que estes isolados não diferiram significativamente no crescimento frente a diferentes concentrações de HgCl_2 . Os três isolados tiveram crescimento inferior a *Serratia* sp, nas condições estabelecidas neste trabalho, porém, ainda assim, tiveram bons resultados quanto a tolerância ao mercúrio, sendo resistentes a pelo menos 25 μM em meio líquido e sólido.

ICaB07 teve resultado muito semelhante ao da *Serratia* sp em meio ágar-LB, teve crescimento reduzido com o aumento da concentração salina no meio, porém mostrou ser resistente a pelo menos 25 μM em meio líquido e sólido nas condições estabelecidas neste trabalho.

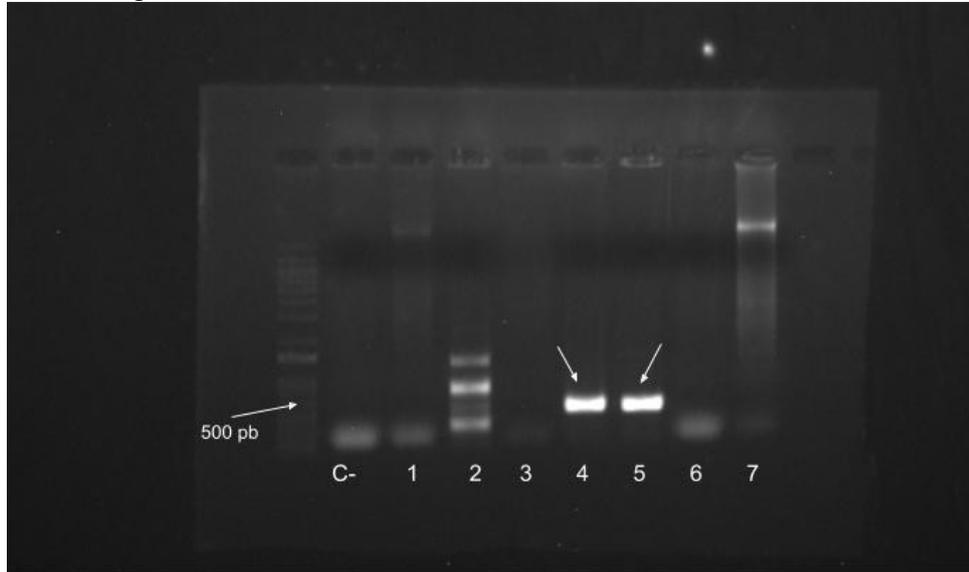
Os melhores resultados com relação à resistência ao mercúrio inorgânico, foram apresentados pelos isolados do gênero *Aeromonas* sp ou *Oceanimonas* sp. Os achados são condizentes com o local de coleta dos microrganismos e com resultados experimentais descritos na literatura, uma vez que os mares são habitat desse gênero bacteriano, e são relatadas na literatura que bactérias desse gênero podem ser resistentes a substâncias xenobióticas. Dentre essas substâncias aparecem, destacam-se os metais pesados, incluindo o mercúrio. A presença do gene *merA* e/ou operon *mer* já foram anotados no genoma de espécies do gênero. (AZARBAIJANI, 2015; PÉREZ-VALDESPINO, 2014).

O gênero *Sporosarcina* foi encontrado no isolado selecionado que teve menor resistência a mercúrio e menor capacidade de crescimento em meio LB, em relação aos outros isolados caracterizados como *Aeromonas* sp ou *Oceanimonas* sp. O gênero *Sporosarcina* está relacionado a precipitação de carbonato de cálcio, induzida por salinidade. Possui aplicações biotecnológicas na área de bioengenharia (DIKSHIT, 2021).

5.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GENE CODIFICADOR DA ENZIMA MERCÚRIO REDUTASE NOS ISOLADOS RESISTENTES

A análise de PCR para o gene *merA* foi analisada em eletroforese em gel de agarose 0,8% para se realizar incisão e purificação do fragmento de tamanho próximo a 500 pb, correspondente ao tamanho do amplicon do gene *merA*, conforme a Figura 15.

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da PCR do gene rRNA 16S dos isolados resistentes



Legenda: C-: controle negativo (sem DNA); 1: ICaA01; 2: ICaA06; 3: ICaC11; 4: ICaA07; 5: ICaA02; 6: ICaB07; 7: ICaB07 (isolado de um experimento). As setas na canaleta 4 e 5 indicam amplificação do gene *merA*.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Os resultados de sequenciamento mostraram a presença de diversas ampliações não específicas, o que pode ser devido a alguma má adequação deste método de detecção molecular, como primers inadequados ou problemas no programa de temperatura dos ciclos da PCR. Contudo, foram utilizadas as bandas das canaletas 4 e 5 que foram únicas nas respectivas amostras e que mostraram tamanhos adequados, próximos a 500 pb.

O objetivo do estudo era identificar sequências de *merA* que tivessem similaridade com sequências de *merA* de outros microrganismos. Os resultados de sequenciamento obtidos das canaletas 4 e 5 não mostraram alinhamento com qualquer gene *merA* anotado na plataforma BLAST NCBI. O resultado deste estudo corrobora com o sequenciamento do gene rRNA 16S obtido, uma vez que foram encontradas correspondências com porções do genoma de *Aeromonas* sp ou *Oceanomonas* sp identificadas anteriormente, reforçando os resultados encontrados pelo sequenciamento do gene rRNA 16S.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi realizada uma prospecção e caracterização de possíveis bactérias resistentes a mercúrio com aplicação biotecnológica do ASPSP. Ao todo 39 microrganismos foram testados nos moldes experimentais e 8 isolados tiveram algum grau de resistência a mercúrio em meio líquido. Após teste de sensibilidade, seis isolados foram selecionados para sequenciamento do gene 16S, cinco pertencentes ao gênero *Aeromonas* sp ou *Oceanimonas* sp e um pertencente ao gênero *Sporosarcina* sp. Os cinco microrganismos do gênero *Aeromonas* sp ou *Oceanimonas* sp tiveram os melhores resultados experimentais, com destaque ao isolado ICaB07. Dois isolados dos gêneros *Aeromonas* sp ou *Oceanimonas* sp, ICaA07 e ICaA02, tiveram resultado positivo para detecção molecular do gene *merA*, utilizado como marcador de resistência a mercúrio em bactérias.

Os resultados de sequenciamento são condizentes com o *habitat* onde esses microrganismos normalmente poderiam ser encontrados e com resultados encontrados na literatura. Os resultados deste trabalho mostram que os isolados ICaB07, ICaA07, ICaA01, ICac11, ICaA02 são promissores e candidatos para uso em tecnologias biológicas envolvendo resistência a mercúrio. Maiores estudos dos microrganismos selecionados são necessários para concluir seu desempenho e possibilidades de uso ambientais.

7 PERSPECTIVAS

Algumas perspectivas são importantes de serem destacadas quanto a continuação, desenvolvimento e aprimoramento da linha de pesquisa:

- Desenvolver ensaio de remoção de mercúrio baseado em balanço de massa;
- Analisar o mercúrio bioacumulado e mercúrio volatilizado a fim de calcular o grau de remoção do metal;
- Realizar varredura de outros microrganismos coletados no arquipélago;
- Observar por microcopia de varredura (MEV), possíveis depósitos de mercúrio;
- Aplicar método de extração de DNA plasmidial e outros métodos moleculares para detecção do gene *merA*;
- Utilizar novos primers para identificação molecular do gene *merA*.

8 REFERÊNCIAS

AZARBAIJANI, Reza; YEGANEH, Laleh Parsa; BLOM, Jochen; *et al.* Comparative genome analysis of *Oceanimonas* sp. GK1, a halotolerant bacterium with considerable xenobiotics degradation potentials. **Annals of Microbiology**, v.66, n.2, p.703–716, 2016.

BARKAY, Tamar; WAGNER-DÖBLER, Irene. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. *In: Advances in Applied Microbiology*. [s.l.]: Elsevier, 2005, v. 57, p. 1–52.

BECKERS, Felix; RINKLEBE, Jörg. Cycling of mercury in the environment: Sources, fate, and human health implications: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 9, p. 693–794, 2017.

BROUSSARD, Larry A; HAMMETT-STABLER, Catherine A; WINECKER, Ruth E; *et al.* The Toxicology of Mercury. v. 33, n. 8, p. 10,

DASH, Hirak R.; DAS, Surajit. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 207–213, 2012.

DIKSHIT, Rashmi; DEY, Arjun; KUMAR, Alope. *Sporosarcina pasteurii* can Efficiently Precipitate Calcium Carbonate at High Salt Concentration. **Geomicrobiology Journal**, v.39, n.2, p.123–134, 2022.

EMBRAPA; **Bioprospecção Microbiana**. Brasília, DF. 2015

IOHARA, K.; IYAMA, R.; NAKAMURA, K.; *et al.* The mer operon of a mercury-resistant *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain isolated from Minamata Bay, Japan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5–6, p. 736–741, 2001.

KANE, Aunica L.; AL-SHAYEB, Basem; HOLEC, Patrick V.; *et al.* Toward Bioremediation of Methylmercury Using Silica Encapsulated Escherichia coli Harboring the mer Operon. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147036, 2016.

MARINHA DO BRASIL; Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (SECIRM); **O Arquipélago de São Pedro e São Paulo: 10 Anos de Estação Científica**. Brasília, DF; 2009

MARTINEZ-FINLEY, Ebany J.; ASCHNER, Michael. Recent Advances in Mercury Research. **Current Environmental Health Reports**, v. 1, n. 2, p. 163–171, 2014.

MURTAZA, Imtiyaz; DUTT, Amit; ALI, Arif. Relationship Between the Persistence of mer Operon Sequences in Escherichia coli and Their Resistance to Mercury. **Current Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 178–183, 2002.

NAGUIB, Martha M.; KHAIRALLA, Ahmed S.; EL-GENDY, Ahmed O.; *et al.* Isolation and characterization of mercury-resistant bacteria from wastewater sources in Egypt. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 308–321, 2019.

NANDA, Manisha; KUMAR, Vinod; SHARMA, D.K. Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to ‘clean-up’ heavy metal contaminants from water. **Aquatic Toxicology**, v. 212, p. 1–10, 2019.

NASCIMENTO, Andréa M A; CHARTONE-SOUZA, Edmar. Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. **Genetics and Molecular Research**, p. 10, 2003.

OMS, Prevenção de Doenças Através de Ambientes Saudáveis; **Exposição ao Mercúrio: Um Grave Problema de Saúde Pública**. 2021

OMS, Preventing Disease Through Healthy Environments; **Exposure to Mercury: A Major Public Health Concern**. 2021

PÉREZ-VALDESPINO, Abigail; CELESTINO-MANCERA, Martin; VILLEGAS-RODRÍGUEZ, Viridiana Lorena; *et al.* Characterization of mercury-resistant clinical *Aeromonas* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1279–1283, 2014.

PNUMA, **Global Mercury Assessment 2018, GMA**. Genebra, Suíça. 2019.

PUTY, Bruna; LEÃO, Luana Ketlen Reis; CRESPO-LOPEZ, Maria Elena; *et al.* Association between methylmercury environmental exposure and neurological disorders: A systematic review. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 52, p. 100–110, 2019.

RICE, Kevin M.; WALKER, Ernest M.; WU, Miaozong; *et al.* Environmental Mercury and Its Toxic Effects. **Journal of Preventive Medicine & Public Health**, v. 47, n. 2, p. 74–83, 2014.

SANTOS-GANDELMAN, Juliana F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, Marcia; MURICY, Guilherme; *et al.* Mercury and methylmercury detoxification potential by sponge-associated bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 3, p. 585–590, 2014.

SEGADE, Susana Río; DIAS, Teresa; RAMALHOSA, Elsa. MERCURY METHYLATION VERSUS DEMETHYLATION: MAIN PROCESSES INVOLVED. p. 33,

SOTERO-MARTINS, Adriana; JESUS, Michele Silva de; LACERDA, Michele; *et al.* A conservative region of the mercuric reductase gene (*merA*) as a molecular marker of bacterial mercury resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 307–310, 2008.

TRAVNIKOV, Oleg; DASTOOR, Ashu; FRIEDMAN, Carey; *et al.* Authors and contributing experts. p. 36.

YAO, C. P.; ALLEN, J. W.; ASCHNER, M. Metallothioneins attenuate methylmercury-induced neurotoxicity in cultured astrocytes and astrocytoma cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.890, p.223–226, 1999.

YOSHIDA, Minoru. Placental to Fetal Transfer of Mercury and Fetotoxicity. **Tohoku J. Exp. Med.** v196, p.79-88.

ZHAO, Lei; MENG, Bo; FENG, Xinbin. Mercury methylation in rice paddy and accumulation in rice plant: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 195, p. 110462, 2020.