

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE**

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES A MERCÚRIO E
CARACTERIZAÇÃO DA MERCÚRIO REDUTASE
DE *Pseudomonas* sp. B50A**

**Patrícia Giovanella Grazziotin
Bióloga/UCS**

Porto Alegre
2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE**

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES A MERCÚRIO E
CARACTERIZAÇÃO DA MERCÚRIO REDUTASE
DE *Pseudomonas* sp. B50A**

**Patrícia Giovanella Grazziotin
Bióloga/UCS**

Dissertação apresentada como um
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro, 2010

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

G785i Grazziotin, Patricia Giovanella

Isolamento de microrganismos resistentes a mercúrio e caracterização da mercúrio redutase de *Pseudomonas* sp. B50A. – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Flávio Anastacio de Oliveira Camargo

1. Mercúrio 2. Resistência microbiana a metais 3. *Pseudomonas* I. Camargo, Flávio Anastacio de Oliveira, orient. II. Título.

CDU 579.84 (043)

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida e suporte financeiro ao projeto.

Ao PPGMAA pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos professores do PPGMAA.

Aos meus orientadores de IC, Ana Paula Delamare e Sérgio Echeverrigaray, pela oportunidade de entrar no meio acadêmico e conhecer a microbiologia.

Ao Prof. Clésio Gianello por disponibilizar o equipamento de espectrofotometria, e a Tais Ambrozi pelas análises de mercúrio e amizade.

Ao Prof. Flávio A. O. Camargo pela oportunidade, confiança e orientação.

Aos amigos do laboratório pelo convívio enriquecedor.

Ao Jomar Laurino: professor, amigo e incentivador.

Aos meus amigos, pelos conselhos, companheirismo, inúmeras conversas e apoio para a concretização do meu mestrado.

À Lucélia Cabral, pela amizade, companheirismo, apoio, discussões e auxílio com os experimentos.

À Kuki e ao leão, meus felinos e companheiros inseparáveis.

À Dona Marlene, pela amizade, preocupação dispensada a mim e por todo apoio à realização da minha formação.

Ao Felipe, por tudo.

À minha mãe Irene, pela sua difícil jornada e luta constante, e por tudo que me ensinou sobre a vida.

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES A MERCÚRIO E CARACTERIZAÇÃO DA MERCÚRIO REDUTASE DE *Pseudomonas sp.* B50A¹

Autor: Patricia Giovanella Grazziotin

Orientador: Flávio A. de Oliveira Camargo

Resumo

O mercúrio (Hg) é um dos metais com maior impacto sobre os ecossistemas e sua presença no ambiente tem origem natural ou antropogênica. O acúmulo do mercúrio no ambiente tem afetado a integridade dos ecossistemas e a saúde do homem. Contudo, algumas bactérias desenvolveram mecanismos de resistência, e com isso desempenham um papel muito importante na redução enzimática de Hg (II) a Hg⁰, a qual é uma forma volátil e de menor toxicidade deste metal. Assim, a redução microbiana de Hg (II) representa um recurso para desenvolvimento de métodos alternativos de tratamento de resíduos que contenham este metal, oferecendo vantagens, como baixo custo operacional e alta eficiência na remoção de mercúrio. Deste modo, os objetivos do estudo foram isolar microrganismos resistentes a mercúrio; determinar a concentração inibitória mínima de Hg; bem como, estimar a capacidade de volatilização de mercúrio pelos microrganismos selecionados; a dinâmica da volatilização do mercúrio; e a caracterização da enzima mercúrio redutase produzida pelo isolado B50A. Foram selecionadas 16 bactérias Gram-negativas resistentes a altas concentrações de mercúrio (50 mg L⁻¹ a 210 mg L⁻¹), sendo que todos os isolados foram capazes de volatilizar este metal. Os isolados B50A e M50C, volatilizaram 86% do mercúrio presente no meio e a remoção de Hg (II) não dependeu de altas taxas de crescimento populacional. A enzima presente no extrato bruto de B50A apresentou atividade ótima em pH 8, e temperaturas entre 37°C e 45°C. Os íons NH₄⁺, Ba²⁺, Sn²⁺, Ni²⁺ e Cd²⁺ não inibiram nem estimularam significativamente (p>0,05) a atividade da mercúrio redutase do isolado B50A, porém ocorreu queda significativa (p>0,05) da atividade na presença de Ca²⁺, Cu⁺ e K⁺. As bactérias isoladas e a enzima de B50A foram eficientes na redução de Hg (II) a Hg⁰, o que evidencia o potencial destes microrganismos para desenvolvimento de tecnologias e processos de biorremediação de resíduos contaminados com mercúrio.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (53 p.), Fevereiro, 2010.

SCREENING OF MERCURY RESISTANT MICRORGANISMS AND CHARACTERIZATION OF MERCURY REDUCTASE FROM *Pseudomonas* sp. B50A¹

Author: Patricia Giovanella Grazziotin

Adviser: Flávio A. de Oliveira Camargo

Abstract

Mercury (Hg) is one of the metals that has had profound influence on all ecosystems, and can occur in the in the environment as a natural and anthropogenic phenomenon. The accumulation of mercury has affected the integrity of ecosystems and human health. However, some bacteria have developed biological mechanisms for mercury resistance, and subsequently perform an important role in the enzymatic reduction of Hg(II) to Hg(0), this being a volatile and less toxic form of the metal. The process of microbial Hg (II) reduction represents an area of development for alternative methods of waste treatment, with potentially low operating costs and high removal efficiencies. This study presents the screening of microorganisms resistant to mercury, and the determination of the minimum inhibitory concentration of Hg. An estimation of the mercury volatilization by selected microorganisms, the dynamics of volatilization, and the characterization of mercury reductase produced by the isolated B50A, are all addressed. Sixteen Gram-negative bacteria resistant to high concentrations of mercury (50 mg L⁻¹ to 210 mg L⁻¹) were selected, and these isolates showed ability to volatilize the metal. The dynamics of the volatilization of the B50A and M50C isolates demonstrated that in only 4 hours of incubation it was possible to volatilize 86% of the mercury present in the culture. The latter also demonstrating that the removal of Hg (II) is independent of high biomass formation. The enzyme present in the crude extract of B50A showed optimal activity at pH 8 and temperatures ranging between 37 and 45°C. The presence of NH₄⁺, Ba²⁺, Sn²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ did not significantly (p<0,05) inhibited or stimulated the activity of mercury reductase B50A, but significant (p<0,05) reduction in activity was observed in the presence of Ca²⁺, Cu⁺ and K⁺. The isolates bacteria and mercury reductase produced by the isolated B50A were efficient in reducing Hg (II) to Hg⁰, this demonstrated the potential of these microorganisms to augment technologies for bioremediation processes for waste contaminated with mercury.

¹Master of Science Dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (53p.) February, 2010.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
RELAÇÃO DE FIGURAS	vii
RELAÇÃO DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Ocorrência, usos e fontes de exposição ao mercúrio.....	4
2.2 Toxicologia do mercúrio.....	6
2.3 Dinâmica do mercúrio no ambiente.....	8
2.4 Transformação microbiana do mercúrio	12
2.5 Mecanismos de resistência microbiana ao mercúrio.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Coleta das amostras de resíduos.....	18
3.2 Isolamento dos microrganismos resistentes a mercúrio.....	18
3.3 Identificação dos isolados.....	19
3.4 Concentração inibitória mínima de mercúrio	21
3.5 Determinação do número de células viáveis.....	21
3.6 Determinação analítica do mercúrio	22
3.7 Capacidade de volatilização de mercúrio pelos isolados.....	23
3.8 Caracterização da mercúrio redutase produzida por <i>Pseudomonas sp.</i> B50A	25
3.9 Determinação da concentração de proteínas solúveis.....	27
3.10 Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Isolamento e Identificação dos microrganismos	29
4.2 Concentração inibitória mínima de mercúrio	30
4.3 Volatilização de mercúrio pelos isolados.....	32
4.4 Caracterização da mercúrio redutase de <i>Pseudomonas sp.</i> B50A no extrato bruto.....	40
5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1.** O ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente. Setas sólidas representam transformação ou absorção de mercúrio. Setas ocas indicam fluxo de mercúrio entre diferentes compartimentos no ambiente. A largura das setas indicam a importância relativa do fluxo na natureza. A especiação de Hg (II) em águas anóxicas ou em presença de oxigênio é controlada por cloro, hidróxidos e enxofre. Transformações mediadas por microrganismos são representadas por círculos que representam bactérias. SRB para bactérias sulfato redutoras, *merB* e *merA* referem-se a atividade dos genes que codificam as enzimas organomercurio liase e mercúrio redutase respectivamente. Um grupo de pontos indica o envolvimento de algas unicelulares 9
- FIGURA 2.** Modelo de resistência do operon *mer* típico de bactérias Gram-negativas. O símbolo (●) indica resíduos de cisteínas. O X refere-se a um solvente nucleofílico genérico. RSH é um grupo thiol de baixo peso molecular como a glutathiona. Genes ou proteínas entre parênteses indicam que não ocorre em todos os exemplos de operon *mer* (Adaptado de Barkay et al., 2003)..... 15
- FIGURA 3.** Concentração inibitória mínima de $C_4H_6HgO_4$ e $HgCl_2$ sobre os isolados avaliados, após 48 horas de incubação a 30°C 31
- FIGURA 4.** Percentual de volatilização de Hg^{2+} pelos isolados resistentes a mercúrio após 24 horas de incubação a 30°C em meio LB contendo 2 mg L^{-1} de Hg^{2+} . Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre isolados ($p < 0,05$) 33
- FIGURA 5.** Percentual de volatilização de Hg^{2+} pelos isolados B50A, M50C e V1 em baixa concentração de cloreto de mercúrio (2 mg L^{-1}), e próximo a concentração inibitória mínima (70 mg L^{-1}), após 24 horas de incubação a 30°C. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre concentrações ($p < 0,05$)..... 35

FIGURA 6.	Crescimento dos isolados B50A, M50C e V1 em baixa concentração de cloreto de mercúrio (2 mg L^{-1}) e próximo a concentração inibitória mínima (70 mg L^{-1}), após 24 horas de incubação a 30°C . Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre concentrações ($p < 0,05$).....	37
FIGURA 7.	Dinâmica da volatilização de Hg^{2+} (■) e crescimento na presença (2 mg L^{-1}) (●) e ausência (▲) de mercúrio (<i>Pseudomonas sp.</i> B50A). Pontos representam a média de três repetições e as barras o erro padrão	38
FIGURA 8.	Dinâmica da volatilização de Hg^{2+} (■) e crescimento na presença (○) e ausência (●) de mercúrio (<i>Proteus mirabilis</i> M50C). Pontos representam a média de três repetições e as barras o erro padrão.....	39
FIGURA 9.	Atividade da mercúrio redutase presente no extrato bruto em diferentes tempos de reação, após 24 e 48 horas de incubação a 30°C . Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre tempos de reação ($p < 0,05$).....	40
FIGURA 10.	Efeito do aumento da quantidade de extrato bruto sobre a atividade enzimática em diferentes tempos de reação. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre tempos de reação ($p < 0,05$).....	42
FIGURA 11.	Efeito da variação da temperatura sobre a atividade da enzima mercúrio redutase presente no extrato bruto. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre temperatura ($p < 0,05$).....	43
FIGURA 12.	Efeito da variação do pH do meio de reação sobre a atividade da enzima mercúrio redutase presente no extrato bruto. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre pH ($p < 0,05$).....	44
FIGURA 13.	Efeito de íons sobre a atividade da enzima mercúrio redutase presente no extrato bruto. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre íons ($p < 0,05$)	45

FIGURA 14. Efeito do aumento da concentração do substrato (Hg^{2+}) como indutor de atividade da mercúrio redutase presente no extrato bruto. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem significativamente entre concentrações de Hg ($p < 0,05$) 46

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1 Identificação dos isolados dos resíduos provenientes do SICECORS (A, B e V), STELAS - líquido (C), STELAS - lodo (M), baseada no sequenciamento parcial da região 16S do rRNA	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATM: Atmosfera

DNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO: Densidade ótica

EB: Extrato bruto

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

LB: Luria Bertani

Hg⁰: Mercúrio elementar na forma volátil

Hg: Mercúrio

Hg (II): Mercúrio divalente

Kda: quilodalton

MerA: Enzima mercúrio redutase

MerB: Enzima organomercúrio liase

MerD: Proteína reguladora

MerP: Proteína periplasmática

MerR: Proteína reguladora

MerT: Proteína de membrana interna

N: Normal

NA: Ágar nutriente

NAD⁺: Nicotina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH: Nicotina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

PB: Pares de base

RPM: Rotações por minuto

STELAS: Sistema de tratamento de efluentes do laboratório de análise de solos da UFRGS.

TRIS: Hidroximetilaminometano

UFC: Unidades formadoras de colônias

V: Volts

W: Watts

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente expansão tecnológica e industrial dos diferentes setores, há um incremento da quantidade e complexidade dos resíduos tóxicos produzidos. O descarte de resíduos com elevada toxicidade fora dos padrões da legislação ambiental vigente, bem como a sua incorreta manipulação nos diversos ecossistemas naturais, ocasionam danos inevitáveis ao ambiente.

A questão da contaminação dos ecossistemas por metais pesados é um dos principais objetos de estudo das ciências relacionadas com o ambiente. Isso se deve ao fato de que essas substâncias químicas apresentam alta toxicidade e propriedades de acumulação nos organismos. O mercúrio destaca-se neste contexto, por se tratar de um poluente que circula no ar, na água e no solo; por sua alta toxicidade e pela biomagnificação na cadeia alimentar. Este metal é liberado ao ambiente a partir de fontes naturais (gaseificação da crosta terrestre, emissões vulcânicas e evaporação natural de corpos d'água) e antrópicas, como a mineração de ouro e prata, indústrias de cloro e soda, petrolífera, eletrônica e de medição a fabricação de tintas e os equipamentos médicos.

O mercúrio se apresenta em três formas químicas na natureza: mercúrio inorgânico elementar, vapor ou líquido, não reativo; sais ou minerais

mercuriais inorgânicos; e mercuriais orgânicos. O Hg inorgânico elementar possui baixa solubilidade e é considerado a forma menos tóxica deste metal. A toxicidade dos compostos mercuriais inorgânicos está intimamente relacionada ao ânion ao qual o Hg se liga, o qual afeta sua hidrossolubilidade. Dentre os compostos contendo mercúrio, os orgânicos, especialmente o metilmercúrio, é considerado o mais tóxico e é o responsável pelos danos mais importantes à saúde humana.

Apesar de o mercúrio ser tóxico, tanto para células eucarióticas quanto para procarióticas, alguns microrganismos apresentam mecanismos de resistência a este metal, que está relacionado ao operon *mer*. Possivelmente a resistência bacteriana ao mercúrio ocorre como resposta à pressão ambiental exercida pelo próprio contaminante. Bactérias que possuem o operon *mer* são capazes de reduzir enzimaticamente o mercúrio (II) para a forma volátil e menos tóxica de mercúrio Hg⁰. Essa resposta adaptativa dos microrganismos ao Hg representa um recurso para remediação de áreas contaminadas por este metal.

A remediação de ambientes contaminados com cátions metálicos tóxicos tem empregado convencionalmente, técnicas físicas e químicas que incluem precipitação, filtração, recuperação eletroquímica e a separação por membrana; além de outras como escavação, depósito dos resíduos em aterros sanitários ou ainda recobrimento do sítio contaminado. Essas técnicas são pouco eficazes por não remediarem efetivamente o ambiente contaminado e por apresentarem baixa competitividade econômica. Por isso, há necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos de tratamento de efluentes e solos

contaminados por este metal, que aliem a possibilidade de aplicação em áreas extensas, baixo custo de operação e eficiência de remoção de Hg (II).

Sendo assim, este estudo teve como objetivos: selecionar microrganismos resistentes ao mercúrio (II) e acetato de mercúrio a partir de resíduos industriais contendo Hg; determinar a concentração inibitória mínima de Hg (CIM) sobre os isolados; estimar a capacidade dos isolados em volatilizar mercúrio (II); conhecer a dinâmica da volatilização do mercúrio durante o crescimento celular; e caracterizar a enzima mercúrio redutase produzida pela *Pseudomonas* sp. B50A.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ocorrência, usos e fontes de exposição ao mercúrio

O mercúrio ocorre naturalmente no ambiente em diferentes espécies químicas. As principais formas de mercúrio são: elementar, orgânica e inorgânica. Estas por sua vez apresentam solubilidade, reatividade e toxicidade distintas, causando diferentes impactos no ecossistema e na saúde do homem (UNEP, 2002). O mercúrio é raramente encontrado como elemento livre na natureza, estando em baixas concentrações e distribuído de forma ampla por toda crosta terrestre. Este elemento é emitido para o ambiente por inúmeras fontes naturais e antropogênicas, por meio de combinações complexas, envolvendo reações químicas, físicas e biológicas (Pirrone & Maffey, 2005).

As fontes mais importantes para extração de mercúrio são as reservas de minério de cinábrio (HgS), encontradas em rochas próximas de atividades vulcânicas recentes, em fraturas minerais e em áreas próximas de fontes de águas termais. Uma das principais reservas deste elemento encontra-se nas minas de Almadén, na Espanha, que estão em operação desde 400 d.C. Além destas, existem outras minas de expressão na Itália, Iugoslávia, Rússia, América do Norte, Japão, Filipinas, China, Turquia e Irlanda (Biester et al., 1999).

Um dos usos mais frequentes do mercúrio é como cátodo na solução de cloreto de sódio, a fim de se produzir soda cáustica e cloro gasoso. O mercúrio

é vastamente utilizado na indústria eletrônica, para fabricação de lâmpadas e em células de baterias, além da indústria de equipamentos de medição, em laboratórios e equipamentos médicos. Compostos contendo mercúrio são utilizados na fabricação de tintas, devido a sua ação fungicida e na odontologia, como amálgamas dentárias. Na América do Sul, um dos mais importantes usos do mercúrio diz respeito à extração do ouro, devido à sua capacidade de formar liga com esse metal (Verbel & Restrepo, 2002).

Estimativas mostram que as fontes antropogênicas de mercúrio são responsáveis pela liberação de 2250 toneladas ao ano deste poluente na atmosfera, enquanto que fontes naturais como vulcões, corpos aquáticos, solo e vegetação liberam 2700 toneladas ao ano (Pirrone et al. 2001). As indústrias de equipamentos elétricos, cloro-soda e pintura contribuem com aproximadamente 55% do total de Hg antropogênico liberado (WHO, 1989). Outra fonte bastante comum de mercúrio são os compostos de petróleo e seus derivados. A concentração de Hg em petróleo bruto e derivados é altamente dependente da localização geológica do poço de extração, variando de 0,01 mg L⁻¹ a 10 mg L⁻¹ (Wilhelm & Bloom, 2000).

No Brasil, estudos indicam que as principais fontes de emissão antrópica de mercúrio são os garimpos de ouro, responsáveis por mais de 65% do total das emissões. Também foi constatada contribuição significativa das indústrias de aço e ferro (10,4%), do cloro (10,1%) e das queimadas (7,5%) (Lacerda, 1997).

2.2 Toxicologia do mercúrio

O mercúrio se apresenta em três formas químicas na natureza: mercúrio inorgânico elementar, vapor ou líquido, não reativo; sais ou minerais mercuriais inorgânicos; e mercuriais orgânicos. No ambiente, estas formas de mercúrio são transformadas, e o contato com qualquer uma delas pode produzir toxicidade sistêmica (Vera, 2004). A toxicidade do mercúrio depende da espécie química, porém todas elas possuem em comum a capacidade de induzir mudanças no sistema nervoso dos seres humanos (Verbel & Restrepo, 2002).

As propriedades químicas mais importantes que explicam grande parte dos danos biológicos causados pelo mercúrio são a elevada afinidade que este metal possui pelo enxofre e a facilidade com que ele forma ligações covalentes com este elemento. Quando o enxofre está presente como grupo sulfidril de proteínas, o mercúrio divalente substitui o átomo de hidrogênio para formar mercaptans do tipo X-Hg-SR e Hg-SR, onde X é um grupo eletronegativo e R é um aminoácido como a cisteína, enquanto que os mercuriais orgânicos formam ligações do tipo RHg-SR. Desse modo, mesmo em baixas concentrações no organismo, o mercúrio interfere no metabolismo e nas funções celulares (Verbel & Restrepo, 2002).

O mercúrio elementar é considerado a forma química deste metal menos tóxica ao organismo. Ele é pouco absorvido pelo sistema gastro intestinal, de forma que é quase completamente eliminado e sua ingestão é tida como sem consequência. No entanto, quando inalado, atravessa a membrana alveolar e atinge a circulação sanguínea. Na circulação, ainda na forma

metálica, cruza as barreiras das membranas celulares atingindo especialmente o cérebro (Nascimento & Chasin, 2001).

O sistema nervoso central é o órgão crítico na exposição aos vapores de mercúrio, e os sintomas clássicos são tremores e eretismo. O eretismo caracteriza-se principalmente por uma série de alterações psíquicas como depressão, insônia, dificuldade para concentração, diminuição da memória, timidez excessiva, tristeza, confusão, fadiga, perda do apetite, fobias e sudorese (Picazo & Fernandez, 2000).

Os sais inorgânicos de mercúrio são muito corrosivos para o trato gastro- intestinal, olhos, pele e mucosa. Como consequência ao seu contato ocorre hematemese, colite, hematoquesia, ardor, salivação excessiva, diarreia sanguinolenta, necrose da mucosa intestinal, desidratação e colapso cardiovascular (WHO, 1990). Nos eritrócitos, o mercúrio possivelmente se liga aos grupos sulfidril e a glutathione (Vera, 2004). Os efeitos sobre os rins e os neurotóxicos devem ser considerados como os mais importantes numa avaliação de risco pela exposição aos compostos de mercúrio inorgânico (UNEP, 2002). Ainda que os distúrbios neurológicos estejam mais relacionados à contaminação por mercúrio orgânico (principalmente metilmercúrio), estudos têm demonstrado uma relação do mercúrio inorgânico com sintomas neurológicos, como a insônia, baixa estima, perda da memória, irritabilidade e dificuldade na concentração (Vera, 2004).

Dentre os compostos contendo mercúrio, os orgânicos, especialmente o metilmercúrio é considerado o mais tóxico, e é o responsável pelos danos mais importantes à saúde humana. A toxicidade dos compostos

organomercuriais é devida a sua alta estabilidade química, solubilidade em lipídeos, afinidade pelas proteínas, excreção lenta e facilidade de absorção pelo trato gastrointestinal (Verbel & Restrepo, 2002).

O sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio, onde afeta principalmente áreas específicas do cérebro, como cerebelo e lobos temporais. Intoxicações por metilmercúrio se caracterizam por ataxia, problemas na articulação das palavras, perda da sensibilidade nas mãos, pés e em torno da boca, constrição do campo visual e perda da audição. Em estágios de contaminação severa se observa coma e morte (Clarckson, 2002).

2.3 Dinâmica do mercúrio no ambiente

Na atmosfera, o mercúrio pode se apresentar sob várias formas, nem todas identificadas, pois o seu ciclo global é complexo (Figura 1). A forma química do mercúrio influencia significativamente o seu transporte, pois enquanto algumas formas ligam-se a partículas pesadas e se depositam, o mercúrio elementar pode percorrer longas distâncias. O tempo médio de residência do mercúrio na forma de vapor na atmosfera é estimado entre quatro meses e quatro anos (WHO, 1991). Desta forma, os níveis de mercúrio nas regiões mais remotas do planeta, como nas águas do Ártico, não diferem expressivamente em relação aos níveis das regiões meridionais (Clarkson, 2002).

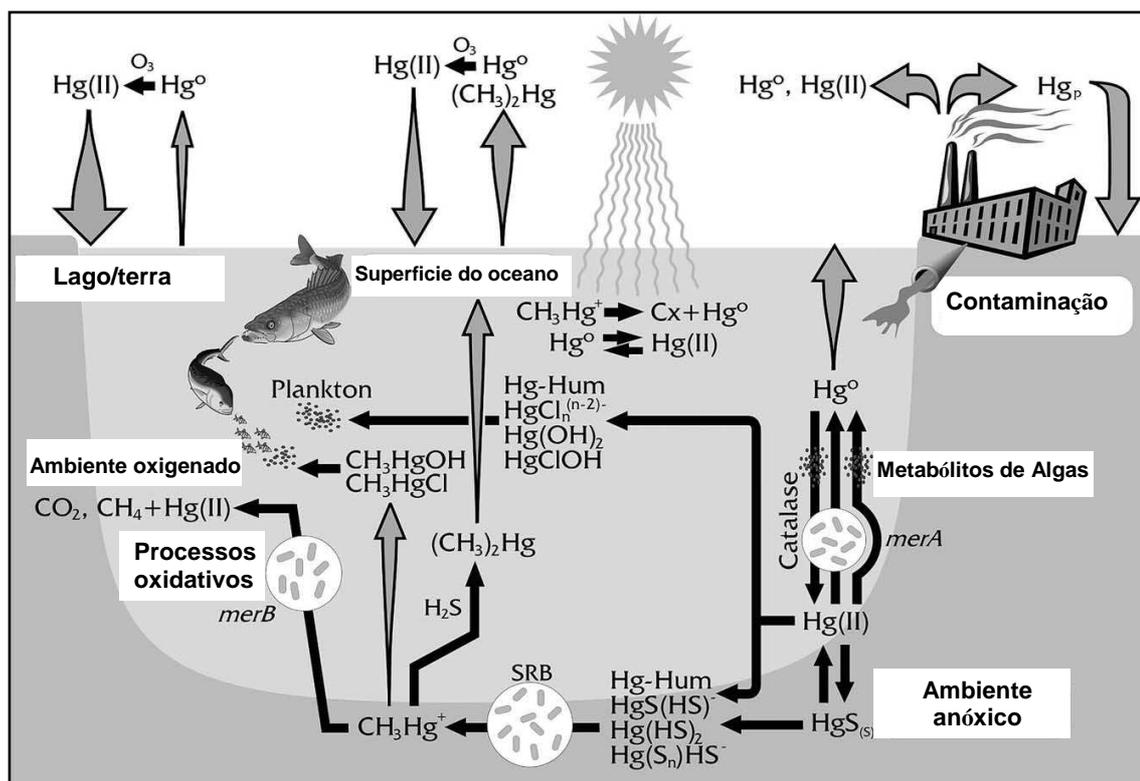


FIGURA 1. O ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente. Setas sólidas representam transformação ou absorção de mercúrio. Setas ocas indicam fluxo de mercúrio entre diferentes compartimentos no ambiente. A largura das setas indica a importância relativa do fluxo na natureza. A especiação de $\text{Hg}(\text{II})$ em águas anóxicas ou em presença de oxigênio é controlada por cloro, hidróxidos e enxofre. Transformações mediadas por microrganismos são representadas por círculos que representam bactérias. SRB para bactérias sulfato redutoras, *merB* e *merA* referem-se a atividade dos genes que codificam as enzimas organo mercúrio liase e mercúrio redutase respectivamente. Um grupo de pontos indica o envolvimento de algas unicelulares. (Adaptado de Barkay et al., 2003).

O mercúrio elementar presente na atmosfera pode ser oxidado dando origem a compostos como óxido de mercúrio (HgO) e cloreto de mercúrio (HgCl_2). Essas substâncias são menos voláteis e mais solúveis que o mercúrio metálico, de modo que, são facilmente depositadas nos particulados da atmosfera ou solubilizadas no vapor de água das nuvens (Murthe et al., 1991). De acordo com World Health Organization (WHO, 1990) mesmo

havendo a diminuição da atividade antropogênica desse metal, haverá contínua contaminação do ambiente pelo processo natural de desgaseificação da crosta terrestre, evaporação dos oceanos e mineração de chumbo, cobre e zinco.

Os solos possuem elevada capacidade de retenção e armazenamento de mercúrio, devido à forte ligação deste metal com a matéria orgânica presente. Por causa deste comportamento, somente quando ligado aos sólidos em suspensão ou ao húmus, ele se torna suscetível a ser transportado pela água. Por esta razão o mercúrio acumulado pode ser liberado para a água por longos períodos de tempo (UNEP, 2002; Bisinoti & Jardim, 2004).

O mercúrio é acumulado no horizonte superficial do solo que possui maior conteúdo de matéria orgânica, razão pela qual os solos orgânicos possuem níveis mais altos de mercúrio, quando comparados aos solos minerais. Em solos com $\text{pH} > 5,5$, o ferro e a argila participam mais eficientemente na adsorção de Hg (II) sendo que a máxima adsorção ocorre em $\text{pH} 7$, enquanto que em solos ácidos com pH inferior a 4 esta retenção não é significativa (Lacerda, et al., 1999).

O potencial redox, o pH e a concentração de cloro estão diretamente relacionadas com as transformações químicas que o Hg sofre no solo. Dependendo das condições de oxi-redução do sistema, podem ocorrer as formas Hg^0 e Hg (II) . Em condições naturais, o Hg raramente ocorre na forma iônica, devido à facilidade em formar complexos (Melamed & Villas Boas, 2002; Adeniji, 2004).

A maior parte do Hg (II) está confinada nos minerais do solo ou adsorvida em superfícies sólidas, inorgânicas e orgânicas. Outra propriedade importante do Hg é a sua habilidade em formar complexos com o íon sulfeto, fazendo com que a forma iônica seja estável na presença de H_2S e HS^- , em condições redutoras (Melamed & Villas Boas, 2002).

No ambiente aquático, o mercúrio contribui com emissões pontuais diretas, erosão, lixiviação e deposição atmosférica sendo que a principal fonte diz respeito à deposição úmida (chuvas). As diferentes espécies de mercúrio introduzidas no sistema aquático são distribuídas e reguladas por processos químicos, biológicos e físicos que ocorrem nas interfaces ar/água e água/sedimento. Na água, as concentrações são em média de 10 ppt, já em sedimentos, a concentração natural é de 200 mg L^{-1} . Isto se dá pela grande afinidade do mercúrio por partículas em suspensão que o transportam até o sedimento (Alexandre, 2006).

A forma predominante de mercúrio nos sistemas aquáticos é a oxidada Hg (II), que pode ser convertida a mercúrio elementar ou metilmercúrio por processos bióticos e abióticos. Em ambientes anaeróbios, a matéria orgânica pode reduzir Hg (II) a Hg^0 , enquanto que o processo inverso é observado em ambientes aeróbios (USEPA, 1997; North Carolina, 1999; Queiroz, 1995; Mayasa, 2001; Alexandre, 2006). Em ambientes aquáticos, a distribuição, a natureza e a biodisponibilidade do Hg são controladas por fatores como: a temperatura e a turbidez da água e as quantidades de argila, fósforo, carbono, enxofre e ferro. Em corpos hídricos aeróbios os complexos solúveis de mercúrio são adsorvidos e removidos pela sedimentação, enquanto

que nos sedimentos anaeróbios, os compostos de Hg precipitados são convertidos em sulfeto de mercúrio (HgS), forma altamente insolúvel, impossibilitando assim a sua reciclagem (UNEP, 2002; Alexandre, 2006).

O mercúrio confinado nos sedimentos dos oceanos, lagos e rios pode permanecer ativo por vários anos e sofrer a ação de agentes orgânicos, como ácidos húmicos e fúlvicos, que quelam as espécies insolúveis e solúveis na água, precipitando-os diretamente da solução para o sedimento (Bisinoti & Jardim, 2004). A metilação abiótica do Hg no ambiente e sua contribuição para a produção de metilmercúrio é um assunto contestado. Trabalhos mostram que os responsáveis pela metilação abiótica incluem os ácidos fúlvicos, húmicos e carboxílicos (Barkay et al., 2003). A metilação do mercúrio é importante em razão da sua biomagnificação na cadeia alimentar, causada pela grande afinidade do metil mercúrio pelas proteínas (Micaroni et al., 2000; Azevedo, 2003).

2.4 Transformação microbiana do mercúrio

Além da contribuição dos processos abióticos nas transformações do mercúrio inorgânico, deve-se destacar o papel dos microrganismos na redução do Hg. A enzima mercúrio redutase num processo de detoxificação transforma Hg (II) em Hg⁰, a forma menos tóxica de mercúrio. A oxidação de Hg⁰ a Hg (II) também pode ocorrer bioticamente na presença de microrganismos aeróbios pela ação da enzima catalase (Verbel & Restrepo, 2002).

Em ambientes aeróbios ou anaeróbios, o metilmercúrio pode ser formado por metabolismo microbiano. A metilação é influenciada por uma variedade de fatores ambientais, como: temperatura, concentração de bactérias no meio, pH, tipo de solo ou sedimento e condições de oxi-redução do meio (Nascimento & Chasin, 2001; Azevedo, 2003). A taxa de síntese biológica do metilmercúrio é determinada principalmente pela concentração, forma química do Hg, composição das espécies microbianas e pelo tamanho da população natural capaz de metilar (Azevedo, 2003). A metilação e demetilação do metilmercúrio podem ocorrer na interface água-sedimento, sedimento ou ainda na coluna de água (Zhang & Planas, 1994). Alguns dos gêneros de bactérias resistentes responsáveis pela demetilação do mercúrio são *Pseudomonas*, *Escherichia* e *Staphylococcus*. Estes microrganismos produzem a enzima organo mercúrio liase, a qual catalisa o rompimento da ligação entre o carbono e o mercúrio, dando origem a mercúrio (II) e CH₄; após a enzima mercúrio redutase pode transformar o Hg (II) em Hg⁰ (Verbel & Restrepo, 2002).

2.5 Mecanismos de resistência microbiana ao mercúrio

Os estudos da resistência bacteriana ao mercúrio iniciaram há pelo menos cinco décadas. O sistema que envolve a defesa bacteriana contra esse metal extremamente tóxico e seus derivados orgânicos tem sido estudado em nível genético e bioquímico, devido ao seu papel na biorremediação ambiental e biomonitoramento. Os genes que codificam as proteínas de resistência ao mercúrio ocorrem naturalmente nos cromossomos, plasmídeos e transposons,

em diferentes formas de arranjos, que podem envolver reguladores, transportadores e vários replicons dentro das células (Barkay et al., 2003).

Nos microrganismos, a resistência à maioria dos metais normalmente ocorre por efluxo, a fim de remover metais do citoplasma e sequestro extracelular do contaminante. Com o mercúrio, os microrganismos utilizam o sistema *mer*. O operon *mer* é um sistema genético regulado, constituído por quatro a cinco genes estruturais, que codificam proteínas de transporte de mercúrio, transformação e regulação dos genes (Silver, 2007).

Em bactérias Gram-negativas, uma MerP (proteína mercúrio periplasmática) utiliza dois resíduos de cisteína para deslocar Hg(II) até o contato com os resíduos proximais de cisteína da MerT (proteína da membrana interna) (Figura 2). Este resíduo de cisteína está localizado na primeira hélice transmembrana. Após esse passo, o Hg interage com o par distal de cisteína da MerT e é transportado através da membrana até o citosol da célula, onde sofrerá a redução pela ação da mercúrio redutase (MerA) (Brown et al., 2002). Neste contexto, o papel das cisteínas nas proteínas Mer é crucial, já que o sistema de importação de mercúrio, da região extracelular para o interior da célula ocorre ao longo de uma cascata de pares de cisteína de diferentes proteínas até o sítio ativo da mercúrio redutase, localizada no citoplasma (Silver, 2007).

A mercúrio redutase (MerA) é uma oxidoreductase flavina disulfídeo (~120 KDa), que atua como um dímero e é constituída por três domínios. A estrutura tridimensional da enzima indica que o sítio ativo é formado pela interação do domínio central de uma subunidade, com o domínio C-terminal da

outra (Schiering et al., 1991, citado por Barkay & Wagner-Dobler, 2005). O domínio central, descrito como um grupo de oxidoreductase piridina nucleotídeo

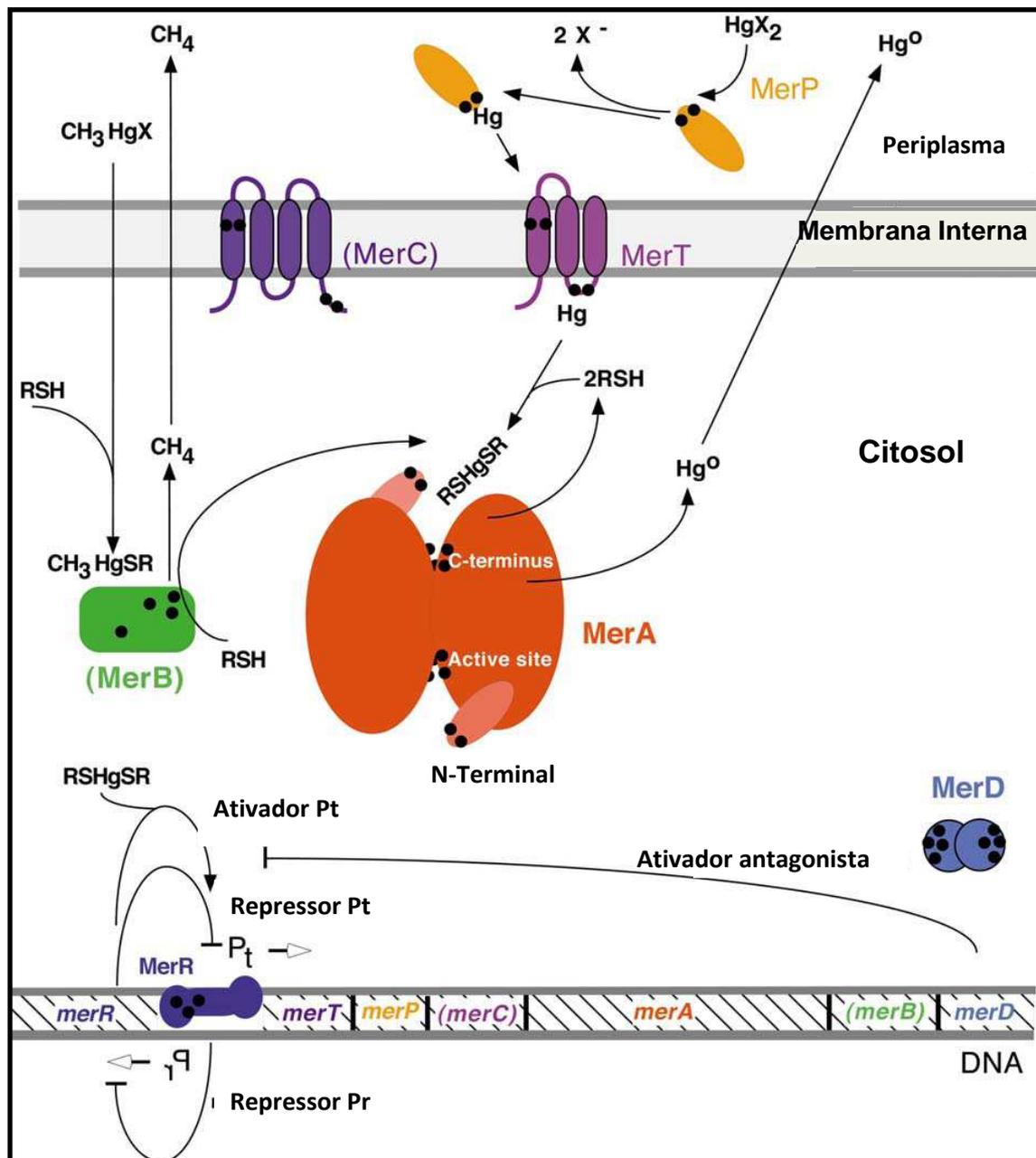


FIGURA 2. Modelo de resistência do operon *mer* típico de bactérias Gram-negativas. O símbolo (•) indica resíduos de cisteínas. O X refere-se a um solvente nucleofílico genérico. RSH é um grupo thiol de baixo peso molecular como a glutatona. Genes ou proteínas entre parênteses indicam que não ocorre em todos os exemplos de operon *mer* (Adaptado de Barkay et al., 2003).

disulfídeo, é o local onde ocorre a catálise e transferência de dois elétrons de NADPH através de FAD para Hg (II). Neste local, existe um par de cisteínas redox ativas que perfaz a reação de transferência de carga. Um domínio C-terminal, encontrado exclusivamente na enzima mercúrio redutase, e não em outras oxidoredutases, em conjunto com o domínio central, constituem o núcleo da enzima MerA (Engst & Miller, 1999). Por fim, existe um domínio N-terminal que tem a função de dirigir o Hg (II) até o sítio ativo da MerA. Este domínio é essencial em células com baixas concentrações de agentes sulfídricos, onde a oferta de Hg (II) tiolado pode ser limitada (Barkay & Wagner-Dobler, 2005).

A expressão do operon *mer* é minuciosamente controlada pelas proteínas reguladoras MerR e MerD, e pela concentração de Hg(II) no interior da célula. Na ausência de Hg (II) o operon é reprimido, e na presença deste metal, ele é fortemente induzido (Brown et al., 2003). A proteína MerR é a reguladora fundamental do sistema *mer*, reprimindo sua própria transcrição e regulação da transcrição dos genes estruturais. Em operons de bactérias Gram-negativas, a MerR se liga como um dímero ao operador/promotor, recrutando a RNA polimerase para formar um complexo ternário.

O mercúrio iônico quando presente, se liga ao domínio C-terminal da MerR, incitando uma mudança conformacional, que é propagada ao DNA na região do operador. Como resultado ocorre o alinhamento e a transcrição do operon *mer*. Já na ausência de mercúrio iônico, a transcrição dos genes estruturais é reprimida, pois não ocorre mudança conformacional da MerR, o alinhamento não se concretiza e conseqüentemente, não ocorre a transcrição do operon *mer* (Brow et al., 2003). Há ainda uma pequena reguladora, MerD,

que aparentemente tem o papel de deslocar o complexo MerR-Hg da região promotor/operador, a fim de permitir que ocorra nova síntese dos genes do operon *mer*. A MerR recém sintetizada, pode então recuperar o operador de *mer* e permitir a transcrição dos genes estruturais na presença de mercúrio. Contudo, quando a concentração de Hg está próxima a zero, o sistema é desligado instantaneamente, já que a transcrição é regulada pela mudança de conformação de MerR com a ligação ao Hg (Champier et al., 2004).

Assim, o sistema *mer* evoluiu para realizar metaloregulação, transporte e catálise enzimática, convertendo o mercúrio de uma forma catiônica altamente reativa para a forma monoatômica volátil (Hg^0) relativamente inerte (Barkay et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras de resíduos

As primeiras amostras de resíduos foram obtidas de uma célula do “*landspreading*” do Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos do Pólo Petroquímico do Sul (SICECORS) contaminado com mercúrio. Para essa etapa, utilizou-se um trado holandês para formar uma amostra composta da camada de 0 a 10 cm para posterior isolamento de microrganismos resistentes a mercúrio. Em seguida, foi coletado lodo e efluente líquido do Sistema de Tratamento de Resíduos do Laboratório de Análise de Solos da UFRGS (STELAS).

3.2 Isolamento dos microrganismos resistentes a mercúrio

Foi utilizada a técnica de enriquecimento, onde 0,1 g das amostras de resíduo ou 0,1 mL de efluente líquido foram adicionadas a 20 mL de meio Luria Bertani (LB) que continha: triptona bacteriológica 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹ suplementado com 25, 50 e 100 mg L⁻¹ de mercúrio na forma de HgCl₂ e incubadas por 24 horas sob agitação de 100 rpm a 30°C. Após este período foi realizada a transferência da cultura microbiana para outro frasco contendo o mesmo meio e incubada nas mesmas condições (em triplicata). Após quatro transferências, 100 µL da cultura foram retiradas e

realizadas diluições até 10^{-4} . Então 100 μL desta diluição foram utilizados para inoculação em ágar nutritivo (5 g L^{-1} de peptona bacteriológica, 3 g L^{-1} de extrato de carne e 18 g L^{-1} de ágar), suplementado com 25, 50 e 100 mg L^{-1} de mercúrio na forma de HgCl_2 . As placas foram incubadas em estufa a 30°C até o aparecimento das colônias. Posteriormente, as colônias foram isoladas conforme diferenças morfológicas e armazenadas em glicerol 25 % a -20°C .

3.3 Identificação dos isolados

Para a extração de DNA cromossomal, colônias isoladas foram incubadas em meio de cultura Luria Bertani por 24 horas a 30°C , para posteriormente passarem pelo processo de extração de DNA. O DNA foi extraído utilizando-se o *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* (Promega), de acordo com o protocolo a seguir. A quantidade de cultura bacteriana utilizada foi 500 μL que passou por um processo de centrifugação por 2 min e o sobrenadante foi então descartado. As células foram ressuspendidas com 500 μL de solução de lise/RNase e incubadas por 10 min a 80°C . Após, as células lisadas foram transferidas a uma mini-coluna, centrifugadas por 3 min e o conteúdo do tubo coletor descartado. Posteriormente, 650 μL da solução de lavagem foram adicionados à mini-coluna e centrifugados por 1 min (esse processo foi repetido mais 3 vezes). Em seguida, 200 μL da solução reidratante de DNA foram adicionados à mini-coluna e incubados por 2 min a temperatura ambiente, e então centrifugados por 1 min. O DNA extraído foi retirado do tubo coletor e armazenado em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL a -20°C .

Para verificar se a extração de DNA foi eficiente, 20 µL do DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% em TBE 0,5X que continha: Tris-HCL (44,5 mM), ácido bórico (44,5 mM), EDTA (1 mM). A amostra de DNA foi adicionada ao tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%, EDTA 1 mM) e aplicada ao gel. O gel foi submetido à voltagem de 100-150 V em tampão TBE 0,5X e posteriormente a um banho de brometo de etídeo por 15 minutos, e então as bandas foram visualizadas pela iluminação ultravioleta.

Os isolados foram identificados com base no sequenciamento parcial da região 16S do rRNA. Os oligonucleotídeos iniciadores universais utilizados para bactérias foram o 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), para a amplificação da região 16S do RNA ribossomal em PCR. A reação de amplificação seguiu o protocolo: tampão de reação (50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 2,5 % Triton X 100), dNTPS (200 µM de cada), 0,2 µM MgCl₂, 0,25 µM de cada primer, 0,8ng/µl de DNA das amostras e 0,02 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research Inc. Watertown, MA, USA, e o programa básico constou de 35 ciclos (desnaturação inicial 95°C por 5 min; desnaturação subsequente, 95°C por 30s; anelamento, 50°C por 1 min; extensão, 72°C por um min e extensão final por 5 min).

Os produtos de PCR foram purificados pelo método padrão de precipitação com PEG 8000 (polietilínoglicol). As reações de sequenciamento dos fragmentos de PCR utilizaram os kits de terminadores marcados da GE Healthcare com oligonucleotídeo iniciador 519r (5'-

GWATTACCGCGGCKGCTG-3'). As reações foram lidas em sequenciador automático de DNA no Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS. Todas as seqüências geradas foram submetidas ao banco de dados *Genbank/NCBI*.

3.4 Concentração inibitória mínima de Mercúrio

Os isolados foram testados quanto a concentração inibitória mínima (CIM) de mercúrio em meio LB contendo mercúrio na forma de HgCl_2 e $\text{C}_4\text{H}_6\text{HgO}_4$, nas concentrações: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210 e 300 mg L^{-1} , incubados por 48 horas a 30°C sob agitação de 100 rpm. O crescimento foi avaliado visualmente após 48 horas de incubação pela turvação do meio. A concentração de mercúrio capaz de interromper o crescimento microbiano (meio sem turvação) foi considerada a concentração inibitória mínima deste metal em relação ao microrganismo avaliado.

3.5 Determinação do número de células viáveis

Todos os microrganismos foram avaliados quanto ao número de células/mL em relação à densidade óptica a 600 nm.

O pré-inóculo foi preparado a partir de uma alçada de cada bactéria inoculada em meio LB, contendo 2 mg L^{-1} de Hg na forma de HgCl_2 e incubado por 24 horas a 30°C sob agitação de 100 rpm. Dessa suspensão bacteriana foi retirada a quantidade de cultura necessária para se obter uma absorbância entre 0,05 e 0,45 a 600 nm em meio LB. Então, diluições de 10^{-4} foram

realizadas e 100 µL foram aplicados em placas contendo NA (três repetições) e estas incubadas por 24 horas a 30°C. Após este período foi realizada contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). A absorbância a 600nm, que correspondeu a aproximadamente 2×10^7 células/mL nos diferentes isolados, foi padronizada para os experimentos posteriores.

3.6 Determinação analítica do mercúrio

A determinação de mercúrio por espectrofotometria de absorção atômica foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solos da UFRGS como descrito a seguir. O espectrofotômetro de absorção atômica utilizado para este experimento foi da marca Perkin Elmer (Analyst 100).

A digestão das amostras foi realizada conforme metodologia empregada pelo Laboratório de Análise de Solos da UFRGS como descrito a seguir. Em frascos tipo DBO, foram colocados 100 µL de cultura sob as condições de cultivo do item 3.5 e adicionados 5 mL de H₂SO₄ 98% e então misturado. Após acrescentou-se 2 mL de HNO₃ 65% e misturou-se novamente. Finalmente 10 mL de uma solução saturada de permanganato de potássio (KMnO₄ 70g L⁻¹) foi combinada a mistura e agitada vigorosamente. Os frascos foram fechados com papel alumínio e as amostras foram submetidas a uma temperatura de 121°C e 1,5 ATM por 15 minutos. As amostras foram retiradas da autoclave, e quando apresentaram temperatura ambiente foram acrescentados 50 mL de água deionizada e 6 mL de cloridrato de hidroxilamida (CINH₂OH₂ 100g L⁻¹).

Os frascos tipo DBO contendo as amostras digeridas, conforme descrito anteriormente foram conectados ao gerador de vapor e borbulhados com gás nitrogênio até apresentarem absorvância zero. Em seguida adicionou-se 4 mL da solução redutora (SnCl_2 50 g L^{-1}), agitou-se vigorosamente e a absorvância foi verificada no comprimento de onda 253,7 nm.

3.7 Capacidade de volatilização de mercúrio pelos isolados

Todos os isolados foram avaliados quanto à capacidade de volatilização do mercúrio e os experimentos foram realizados em triplicata. Inicialmente foi feito um pré-inóculo preparado a partir de uma alçada de cada bactéria inoculada em meio LB contendo 2 mg L^{-1} de Hg na forma de HgCl_2 , e incubado por 24 horas a 30°C sob agitação de 100 rpm. Dessa suspensão bacteriana, foi retirada a quantidade de cultura necessária para se obter 2×10^7 células (conforme avaliação do número de células viáveis em função da densidade óptica a 600 nm item 3.5), e adicionada ao meio LB acrescido de 2 mg L^{-1} de mercúrio na forma de HgCl_2 e então incubado por 24 horas a 30°C a 100 rpm. Após este período de incubação, os erlenmeyers foram transferidos a uma capela de exaustão de gases e abertos para a retirada do Hg volátil, onde permaneceram por 15 min. Após, realizou-se forte agitação dos frascos de onde foram retirados 100 μL da cultura, para posterior digestão da amostra e determinação do mercúrio remanescente por espectrofotometria de absorção atômica conforme item 3.6.

Para avaliar a capacidade de volatilização dos isolados B50A, M50C e V1 e analisar o crescimento próximo a concentração inibitória mínima, foi

feito um pré-inóculo como descrito anteriormente. A quantidade dessa cultura necessária para se obter 2×10^7 células (conforme avaliação do número de células viáveis em função da densidade óptica a 600 nm item 3.5) foi adicionada a erlenmeyers contendo meio Luria Bertani acrescido de 70 mg L^{-1} de mercúrio na forma de HgCl_2 , e então incubado por 24 horas a 30°C a 100 rpm. Após este período de incubação, os erlenmeyers foram transferidos a uma capela de exaustão de gases e abertos para a retirada do Hg volátil onde permaneceram por 15 min. Então, 3 mL da cultura bacteriana foram retirados dos erlenmeyers para leitura da densidade óptica a 600nm, a fim de estimar o crescimento dos microrganismos. Para a digestão das amostras, os frascos foram agitados vigorosamente e foram retirados 100 μL da cultura e diluída em água destilada até 10^{-2} . Este passo foi necessário para que a quantidade de mercúrio presente na amostra ficasse dentro da curva de calibração do aparelho, que é ajustada para uma concentração máxima de 2 mg L^{-1} de mercúrio. As amostras foram posteriormente digeridas e a determinação do mercúrio remanescente foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica conforme o item 3.6.

Para avaliar a dinâmica da volatilização do mercúrio e a curva de crescimento dos isolados B50A e M50C, foi feito um pré-inóculo e padronizada a quantidade de 2×10^7 células (conforme avaliação do número de células viáveis em função da densidade óptica a 600 nm item 3.5) em meio de cultura LB. Este ensaio foi realizado em meio de cultura Luria Bertani contendo 2 mg L^{-1} de mercúrio na forma de HgCl_2 e em meio de cultivo Luria Bertani na ausência de mercúrio. Após a inoculação, os frascos foram mantidos por 24

horas a 30°C sob agitação de 100 rpm. Leituras da densidade óptica a 600 nm foram realizadas no tempo zero, 4, 8, 12, 18 e 24 horas para estimar o crescimento dos isolados na presença e na ausência de mercúrio. Nestes mesmos intervalos de tempo amostras de meio de cultura foram removidas para avaliar a quantidade remanescente de mercúrio e analisadas conforme o item 3.6.

3.8 Caracterização da mercúrio redutase produzida por *Pseudomonas sp. B50A*

A produção do extrato bruto de B50A foi feita em Erlenmeyers de 250 mL contendo 125 mL de meio de cultura Luria Bertani, adicionado de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HgCl_2 . Este meio de cultura foi inoculado com o microrganismo até se obter uma densidade óptica de 0,25 a 600 nm, incubado por 4 horas a 30°C e 100 rpm de agitação. Nova adição de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HgCl_2 foi realizada após 4 horas de incubação e então mantido sob as mesmas condições descritas acima por 20 horas. Após este período, essa cultura foi centrifugada por 10 min a 10000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,35). Em seguida, foram novamente centrifugadas, o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 50 mL de tampão fosfato de sódio para lavagem (esse procedimento foi realizado 3 vezes). Posteriormente, o *pellet* foi ressuspendido em 20 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,35), e as células foram submetidas a 6 pulsos de 35 W de ultrassom em banho de gelo para rompimento celular. Em seguida, o extrato celular foi centrifugado por 45min a 10000 rpm para

remoção de restos celulares. O sobrenadante obtido foi utilizado como fonte de enzimas para as análises enzimáticas sob diferentes condições (extrato bruto).

A atividade da mercúrio redutase do isolado B50A foi determinada em espectrofotômetro a 340nm, pelo monitoramento da queda da absorbância ocasionada pela oxidação do NADH. O volume total da reação era de 3 mL contendo: 89,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HgCl_2 , 5 mmol L^{-1} de Na_2EDTA , 1 mmol L^{-1} de β mercaptoetanol, 0,15 mmol L^{-1} de NADH, tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,35), MgSO_4 0,2 mmol L^{-1} , 200 μL de extrato bruto do isolado B50A. A mistura da reação foi pré-incubada por 10 min a 37°C e a reação foi iniciada pela adição do extrato bruto e NADH. Uma unidade (U) de mercúrio redutase foi definida como a quantidade de enzima por mg de proteína capaz de oxidar 1 μmol de NADH por minuto na presença de HgCl_2 .

Para a delimitação do tempo necessário de incubação do isolado B50A para obtenção de atividade enzimática, a produção do extrato bruto foi executada conforme descrito anteriormente, diferindo apenas no tempo de incubação do microrganismo em meio de cultura. Neste teste, a produção do extrato bruto foi realizada após incubação do microrganismo por 24 horas e 48 horas, para avaliar a diferença da atividade nos diferentes tempos de incubação. O ensaio enzimático foi efetuado como descrito anteriormente.

Para a determinação do tempo ideal de reação e quantidade de extrato bruto para verificação da atividade enzimática, a atividade da mercúrio redutase do isolado B50A foi avaliada empregando-se 200, 300 e 400 μL de extrato bruto na reação. Já para avaliar o melhor tempo de leitura da

absorbância para estimar a atividade enzimática, as leituras de decréscimo de absorbância a 340 nm foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 min.

Para a determinação da temperatura ótima de atividade, o extrato enzimático foi submetido a temperaturas de 25, 37, 45, 55, 65, 75, 85 e 95°C de pré-incubação, enquanto todos os outros parâmetros foram mantidos. Na determinação do pH ótimo de atividade enzimática foram utilizados diferentes tampões na reação enzimática. Tampão citrato de sódio 0,5 M (pHs 4, 5 e 6), tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH 7,35) e tampão tris- HCl 0,5 M (pHs 8 e 9). O efeito de substâncias químicas sobre a atividade enzimática foi verificado conforme o padrão de reação enzimática descrito inicialmente, exceto pela adição de íons no meio reacional. Os íons testados foram: cloreto de níquel (NiCl_2), cloreto de cádmio (CdCl_2), cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de estanho (SnCl_2), cloreto de cobre (CuSO_4), cloreto de bário (BaCl_2) e cloreto de sódio (KCl^+), cujas concentrações foram 1mM; sulfato de amônia ($\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) na concentração 10mM e um controle sem adição dos íons elencados anteriormente.

Para verificar o efeito da concentração de mercúrio na atividade enzimática da mercúrio redutase do isolado B50A, foram adicionados ao meio reacional diferentes concentrações de mercúrio na forma de HgCl_2 (0, 30, 60, 90, 120 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

3.9 Determinação da concentração de proteínas solúveis

A determinação da concentração de proteínas solúveis no extrato bruto foi realizada conforme o método de Lowry et al. (1951), utilizando o

reagente de Folin-Ciocalteu. Inicialmente foi preparado o reagente A, que consistiu de 2% de Na_2CO_3 dissolvido em NaOH 0,1 M. Em seguida, a solução B foi preparada dissolvendo CuSO_4 em uma solução de tartarato de NaK (10 g L^{-1}). No momento da determinação das proteínas solúveis, 50 mL do reagente A foi misturado com 1 mL do reagente B, dando origem ao reagente C. Foi adicionado 1 mL de extrato bruto e 5 mL do reagente C, incubado por 10 min em temperatura ambiente e na ausência de luz. Em seguida, 500 μL do reagente Folin-Ciocalteu 1N foi adicionado a reação, agitado e mantido por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período, a absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro a 750nm. A concentração de proteína foi determinada pela comparação com a curva-padrão preparada com albumina sérica bovina.

3.10 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram produzidos em triplicata e submetidos à análise de erro padrão; análise de variância e teste de média (Tukey), quando significativo ($p < 0,05$), utilizou-se o programa estatístico Systat 11. Os parâmetros cinéticos da mercúrio redutase (K_m e V_{max}) foram determinados utilizando o ajuste dos resultados a uma equação hiperbólica descrita por Michaelis-Menten ($v_o = V_{max} [S] / [S]^{1/2} + [S]$; onde $[S]^{1/2} = K_m$) (Farrell & Ranallo, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e Identificação dos microrganismos

Pela análise da região 16s do rRNA foi possível identificar que dez isolados pertencem ao gênero *Pseudomonas*, quatro ao *Enterobacter*, um ao *Proteus* e outro ao *Serratia* (Tabela 1). Inúmeros trabalhos têm mostrado que bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem alta resistência a diferentes formas de mercúrio (Horn et al., 1993, Canstein et al., 1999; Mortazavi et al., 2005; Fortunato & Crespo, 2005; Chadhain et al., 2006). As bactérias deste gênero também têm sido relatadas em maior abundância em relação a outros gêneros, quando em resíduos contendo altas concentrações de Hg (Nakamura et al., 1987).

A resistência ao mercúrio é frequente entre microrganismos Gram-negativos. Segundo Nakamura et al. (2001), ao isolarem 55 bactérias resistentes ao mercúrio, verificaram que somente 4 isolados eram Gram-positivos. Entre os Gram-negativos, 13 eram do gênero *Enterobacter*. Os gêneros *Proteus* e *Serratia* são mencionados com menor frequência na literatura entre as bactérias resistentes ao Hg, do mesmo modo que neste trabalho. Ainda assim, alguns trabalhos associam estes gêneros de bactérias como resistentes, ou ainda como volatilizadoras de mercúrio (Griffin et al., 1985, Henriette et al., 1991; Chadhain, 2006).

TABELA 1. Identificação dos isolados dos resíduos provenientes do SICECORS (A, B e V), do STELAS - líquido (C), do STELAS - lodo (M), baseada no sequenciamento parcial da região 16S do rRNA.

Isolado	Espécies mais próximas	Nº acesso	Nucleotídeos (pb)	Similaridade (%)
A25B	<i>Enterobacter sp.</i>	AB098582.1	1083	100
A50A	<i>Pseudomonas entomophila</i>	CT573326.1	1318	100
B50A	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	GQ398824.1	390	99
B50B	<i>Pseudomonas sp.</i>	AB076857.1	1187	100
B50C	<i>Enterobacter sp.</i>	AB098582.1	1188	99
B50D	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM088477.1	1057	100
B100A	<i>Pseudomonas entomophila</i>	CT573326.1	1189	100
C50A	<i>Pseudomonas putida</i>	X93997.1	609	100
C50B	<i>Pseudomonas putida</i>	EU239185.1	1073	100
M25A	<i>Enterobacter sp.</i>	CP000653.1	425	99
M25B	<i>Enterobacter sp.</i>	DQ985288.1	1248	100
M25C	<i>Serratia marcescens</i>	GU220796.1	802	100
M50C	<i>Proteus mirabilis</i>	AM942759.1	107	100
M100A	<i>Pseudomonas delhiensis</i>	FN433047.1	426	99
M100B	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	EF107515.1	1088	100
V1	<i>Pseudomonas putida</i>	AE015451.1	816	100

4.2 Concentração inibitória mínima de mercúrio

Após 48 horas de incubação em meio LB suplementado com Hg nas concentrações 0 a 300 mg L⁻¹, foi observado alto nível de resistência em todos os isolados, mas com distintas capacidades de tolerância (Figura 3). Estes resultados indicam que a eficiência dos sistemas de desintoxicação do mercúrio pode ser distinta nos diferentes microrganismos avaliados. Os isolados que apresentaram as mais baixas resistências a este metal mostraram

capacidade de crescimento a uma concentração de 50 mg L^{-1} para a forma inorgânica divalente e 60 mg L^{-1} para a forma orgânica acetato de mercúrio.

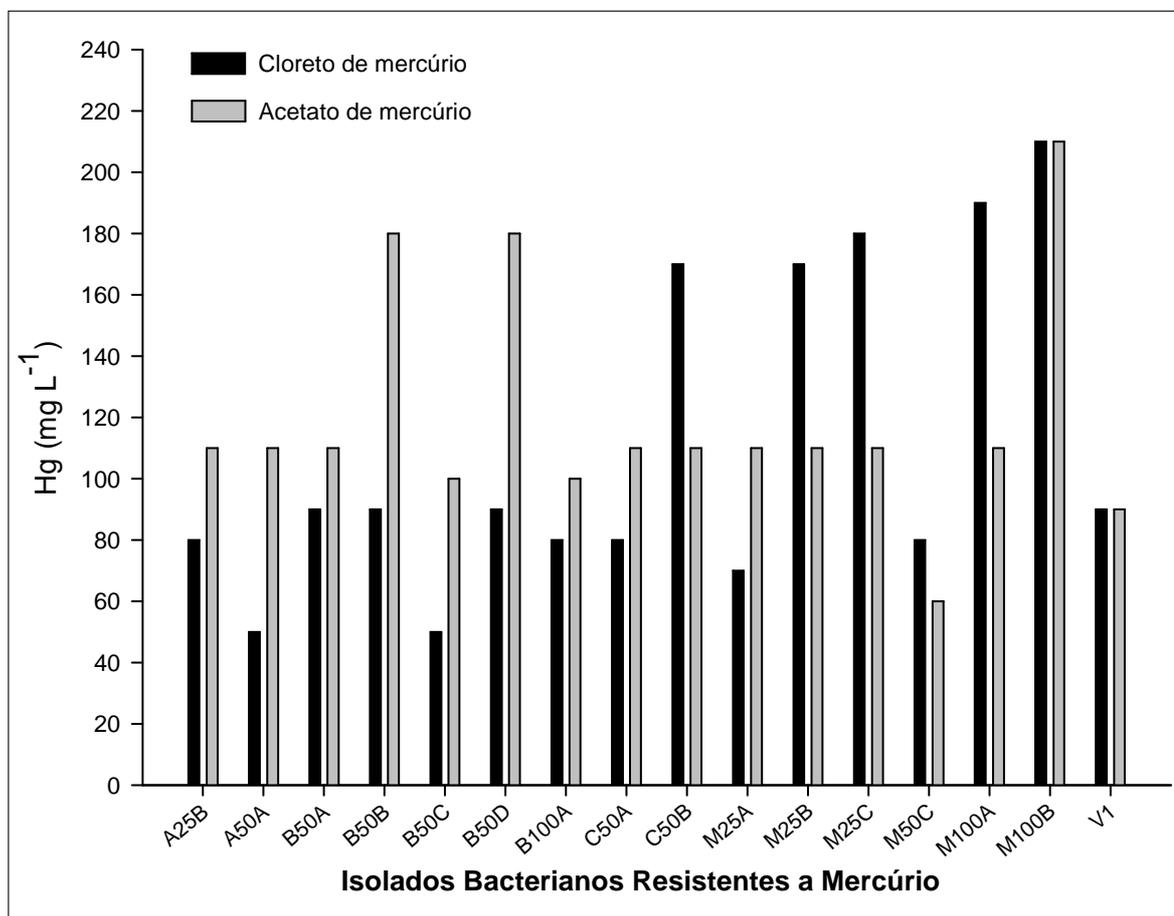


FIGURA 3. Concentração inibitória mínima de $\text{C}_4\text{H}_6\text{HgO}_4$ e HgCl_2 sobre os isolados bacterianos resistentes a mercúrio, após 48 horas de incubação a 30°C .

A maioria dos isolados apresentaram uma CIM entre 70 e 110 mg L^{-1} , assim como observado por outros autores (Ray et al., 1993; Mortazavi et al., 2005; Ball et al., 2006). O microrganismo mais resistente (M100B) cresceu na presença de 210 mg L^{-1} em ambas as formas de mercúrio. Resultado semelhante foi obtido (260 mg L^{-1}) por Chatziefthimiou et al. (2007), quando

avaliaram microrganismos termófilos quimiolitotróficos de uma fonte termal com altas concentrações de Hg.

4.3 Volatilização de mercúrio pelos isolados

Os microrganismos podem interagir com metais tóxicos de diversas maneiras. Na prática, os processos para tratamento destes poluentes envolvem bioissorção, precipitação ou sequestro por biopolímeros e outras moléculas derivadas de células microbianas (Camargo et al., 2007). No caso do mercúrio, bactérias resistentes podem produzir a enzima mercúrio redutase que faz a conversão de Hg (II) a Hg⁰ (Mortazavi et al., 2005). Neste estudo, foi avaliada a capacidade dos microrganismos resistentes ao mercúrio isolados de diferentes resíduos, catalisarem a redução de Hg, a fim de identificar os microrganismos mais eficientes.

Todos os isolados foram capazes de volatilizar o mercúrio presente no meio de cultura após 24 horas de incubação (Figura 4). Dez isolados avaliados foram estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) na capacidade de volatilizar o Hg, sendo que os percentuais de volatilização apresentados por esses microrganismos foram superiores a 80%. Um grupo intermediário de 5 microrganismos (B50C, C50B, M25A, M25B, M100A) foi capaz de volatilizar aproximadamente 70% do mercúrio presente no meio de cultura. Sadhukham et al. (1997), quando avaliaram microrganismos resistentes ao mercúrio, obtiveram resultados semelhantes em relação a volatilização de Hg após 24 horas de incubação. Neste mesmo trabalho foi verificado que a capacidade de volatilização dos microrganismos avaliados, estava relacionada aos seus

valores de CIM, confirmando os resultados de Ghosh et al. (1995). Entretanto, no presente estudo esta relação não foi comprovada, pois em geral os isolados com as mais baixas CIM apresentaram maior capacidade de volatilizar o Hg. O contrário foi observado com os isolados C50B, M25B e M100A, que apesar de terem mostrado as mais altas tolerâncias ao Hg, compuseram o grupo intermediário que volatilizou aproximadamente 70%. Da mesma maneira, o isolado M25C tem alta resistência ao Hg, porém apresentou capacidade de volatilização muito pequena (30%) se comparada aos demais isolados.

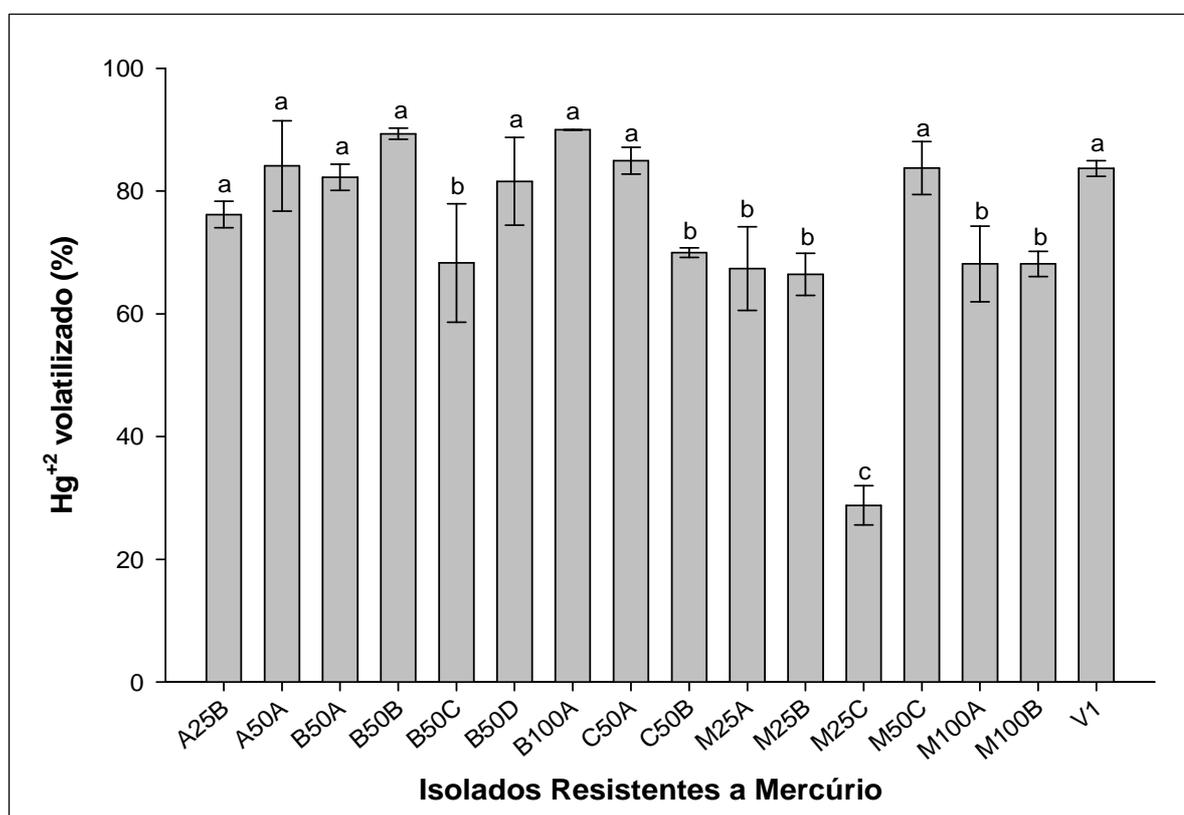


FIGURA 4. Percentual de volatilização de Hg²⁺ pelos isolados resistentes a mercúrio, após 24 horas de incubação a 30°C em meio LB contendo 2 mg L⁻¹ de Hg²⁺. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre isolados (p<0,05).

As divergências aqui encontradas podem ser justificadas por algumas hipóteses, como a presença de metalotioneínas em alguns isolados. Estas proteínas possuem resíduos de cisteína e metionina ricos em sulfidrilas que complexam os metais, protegendo as células da toxicidade destes elementos (Erbe et al. 1995). Além disso, é possível que os genes do operon *mer* não tenham sido induzidos suficientemente pela baixa concentração de Hg (2 mg L^{-1}) no meio de cultivo do ensaio, já que a atividade da enzima mercúrio redutase é induzida e não constitutiva. Outra hipótese, é que os microrganismos avaliados possuam diferentes modos de resistência que não foram explorados nesse experimento.

No ensaio anterior foi verificada a capacidade dos isolados de volatilizar 70 a 90% do mercúrio presente em meio de cultura, quando em baixas concentrações deste elemento (2 mg L^{-1}). Deste modo, três isolados (B50A, M50C e V1) foram selecionados para avaliar a capacidade de volatilização de mercúrio, na concentração máxima de Hg tolerada por esses microrganismos (70 mg L^{-1}).

Na figura 5 é apresentado o percentual de volatilização de Hg nas concentrações 2 mg L^{-1} e 70 mg L^{-1} dos três isolados. A capacidade de volatilização foi reduzida em 22 a 31% em consequência do aumento da concentração de mercúrio no meio de cultivo. A análise estatística mostra diferenças significativas entre a capacidade de volatilização dos isolados B50A, M50C e V1 nas diferentes concentrações testadas. Gosh (1997), constatou que a capacidade dos microrganismos volatilizarem mercúrio foi afetada na presença de altas concentrações de HgCl_2 . Este mesmo autor sugere que isso

é possível devido ao sequestro intracelular do Hg por componentes celulares que se ligam ao metal.

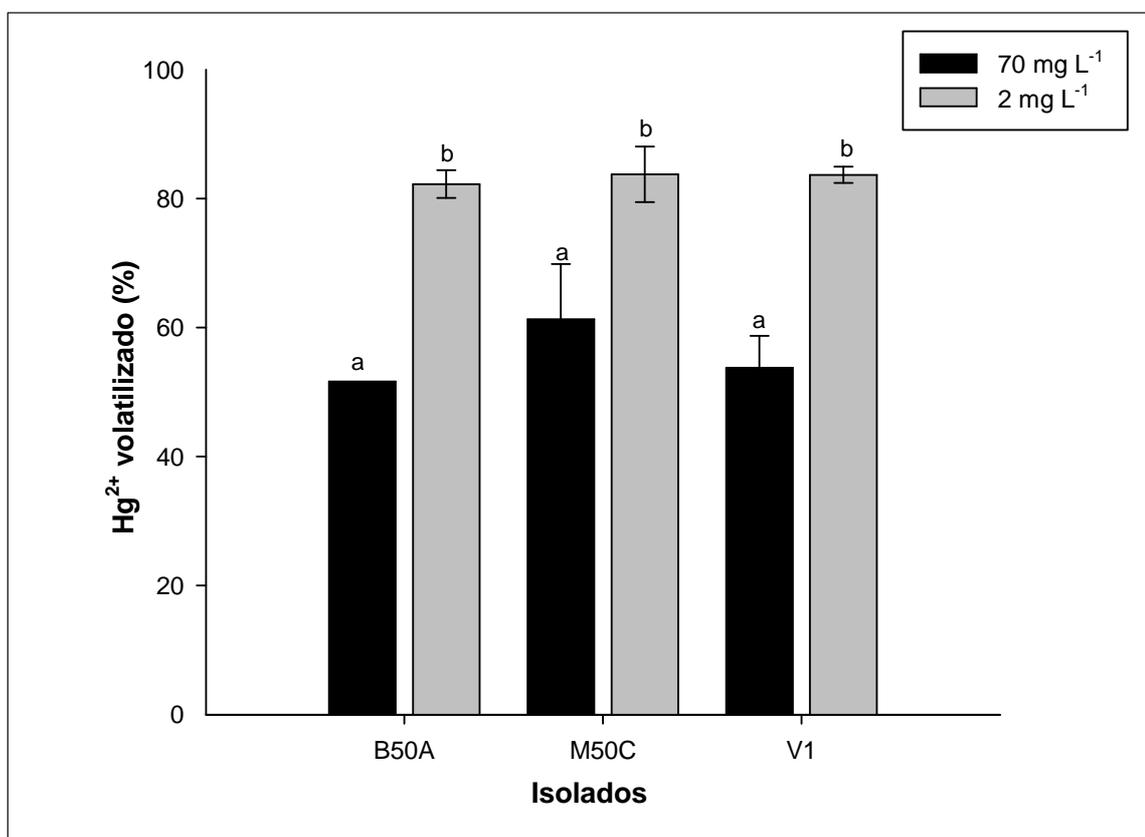


FIGURA 5. Percentual de volatilização de Hg²⁺ pelos isolados B50A, M50C e V1 em meio LB contendo baixa concentração de cloreto de mercúrio (2 mg L⁻¹), e próximo a concentração inibitória mínima (70 mg L⁻¹), após 24 horas de incubação a 30°C. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre concentrações (p<0,05).

A MerP é a proteína sintetizada em maior abundância pelo sistema *mer*, devido ao papel que ela representa no transporte do Hg ao meio intracelular. Essa proteína se liga ao mercúrio presente no periplasma que o leva ao encontro da MerT. Finalmente a MerT o conduz ao interior da célula através da membrana interna dos microrganismos Gram-negativos, e assim o

mercúrio é submetido a ação da mercúrio redutase (Barkay et al., 2003). Sendo assim, é possível supor que em altas concentrações deste metal a MerP pode apresentar seus sítios de ligação ao Hg saturados, mesmo sendo transcrita em abundância e por isso a taxa de volatilização é reduzida em condições com altas concentrações de Hg.

Outra possibilidade diz respeito a MerA, pois um dos fatores que afetam a velocidade de uma reação catalisada por enzimas é a quantidade de substrato. A velocidade máxima de reação de uma enzima é atingida quando praticamente todas as moléculas estão na forma enzima/substrato e a concentração de enzima livre é insignificante. Neste momento a enzima está saturada com o substrato e a velocidade de reação não aumenta, mesmo com substrato presente no meio de reação (Leninguer, 2005). Logo, pode-se pressupor que o Hg presente no meio de cultura poderia estar em excesso em relação ao número de sítios ativos disponíveis da MerA. Conseqüentemente, maior quantidade de Hg poderia ter sido volatilizado caso estes microrganismos tivessem sido submetidos a um tempo maior de incubação.

A Figura 6 apresenta os dados relativos ao crescimento dos isolados B50A, M50C e V1 nas concentrações analisadas. O crescimento é 8 a 15% menor em 70 mg L⁻¹ de mercúrio se comparado ao crescimento dos isolados na concentração de 2 mg L⁻¹. A análise estatística aponta diferenças significativas na densidade óptica de B50A, M50C e V1 na presença de 70 mg L⁻¹ e 2 mg L⁻¹ de Hg. Outros autores (Sadhukhan et al., 1997; Kannan & Krishnamoorthy, 2006), constataram resultados similares ao encontrado neste estudo ao avaliarem a densidade óptica dos isolados em baixas e altas concentrações de

mercúrio, e concluíram que a disparidade observada em altas e baixas concentrações de cloreto de mercúrio não foi significativa. Levando em consideração que os isolados avaliados neste ensaio foram submetidos a concentrações subletais de mercúrio e apresentaram uma queda de crescimento máxima de 15%, é possível presumir que biologicamente não existem diferenças.

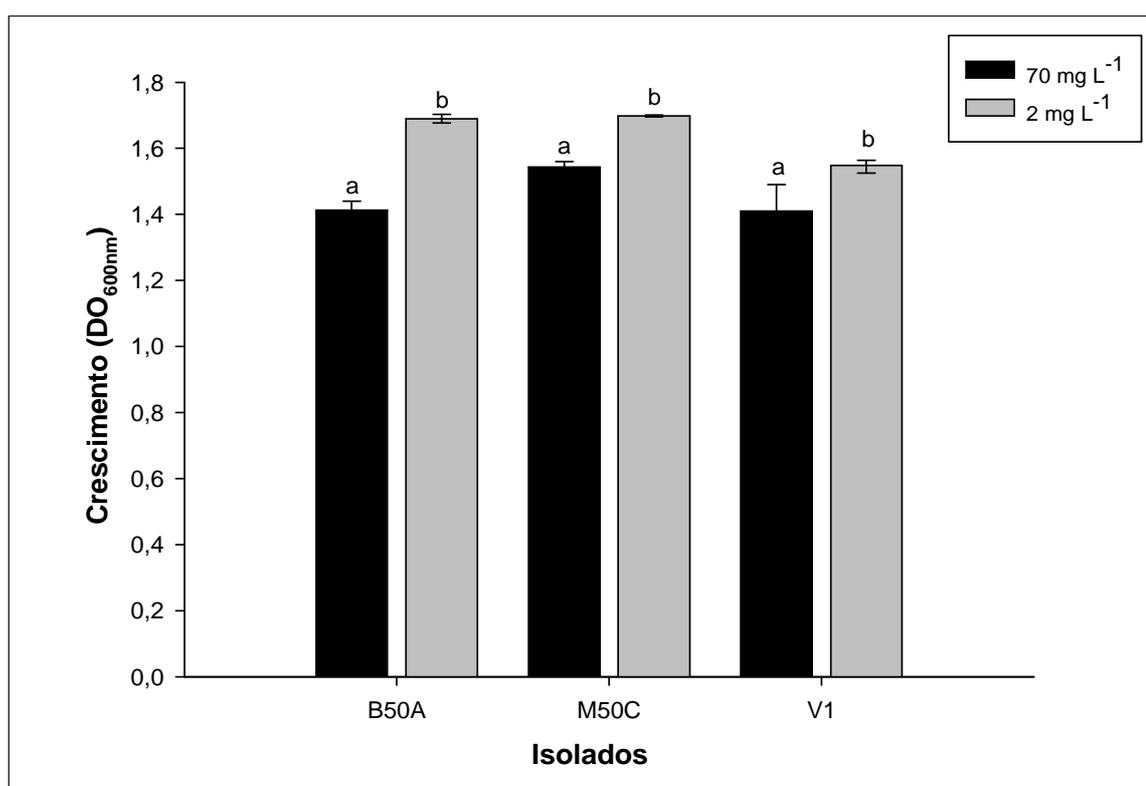


FIGURA 6. Crescimento dos isolados B50A, M50C e V1 em baixa concentração de cloreto de mercúrio (2 mg L^{-1}) e próxima a concentração inibitória mínima (70 mg L^{-1}), após 24 horas de incubação a 30°C . Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre concentrações ($p < 0,05$).

Dois isolados resistentes a Hg (II), B50A e M50C foram selecionados para avaliar a dinâmica da redução do cloreto de mercúrio durante o

crescimento celular. A concentração de mercúrio remanescente e o crescimento bacteriano foram determinados nos períodos de 0, 4, 8, 12 e 18 horas (Figuras 7 e 8). Ambos isolados avaliados (B50A E M50C) apresentaram em quatro horas um rápido crescimento, tanto na presença como ausência de Hg, mantendo este aumento até a última leitura da densidade óptica. A remoção de Hg do meio de cultura foi de 86% para o isolado B50A em apenas 4 horas. Após 8 horas de incubação, esse isolado foi capaz de volatilizar 93% do Hg, e em 18 horas a quantidade de mercúrio remanescente era de apenas 3% da concentração inicial. A remoção de Hg (II) precedida à alta concentração celular em meio de cultura, também foi observada por outros autores (Vetriani et al., 2004; Chatziefthimiou et al., 2007).

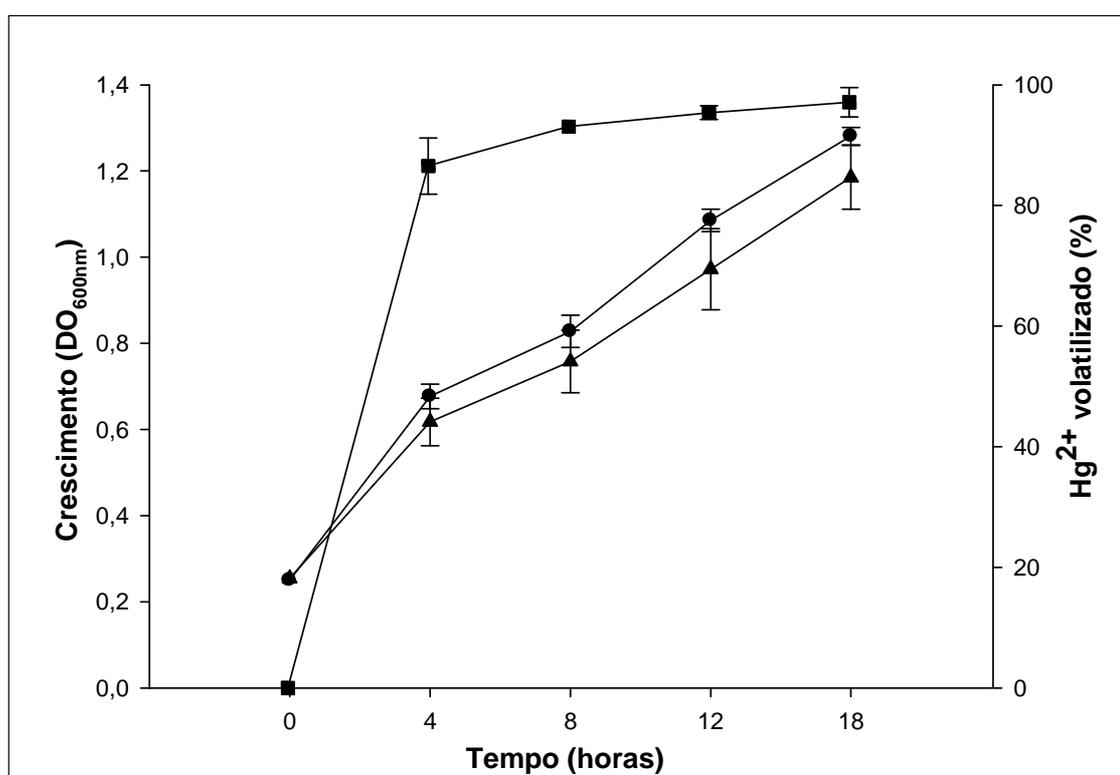


FIGURA 7. Dinâmica da volatilização de Hg²⁺ (■) e crescimento na presença (2 mg L⁻¹) (●) e ausência (▲) de mercúrio (*Pseudomonas sp.* B50A). Pontos representam a média de três repetições e as barras o erro padrão.

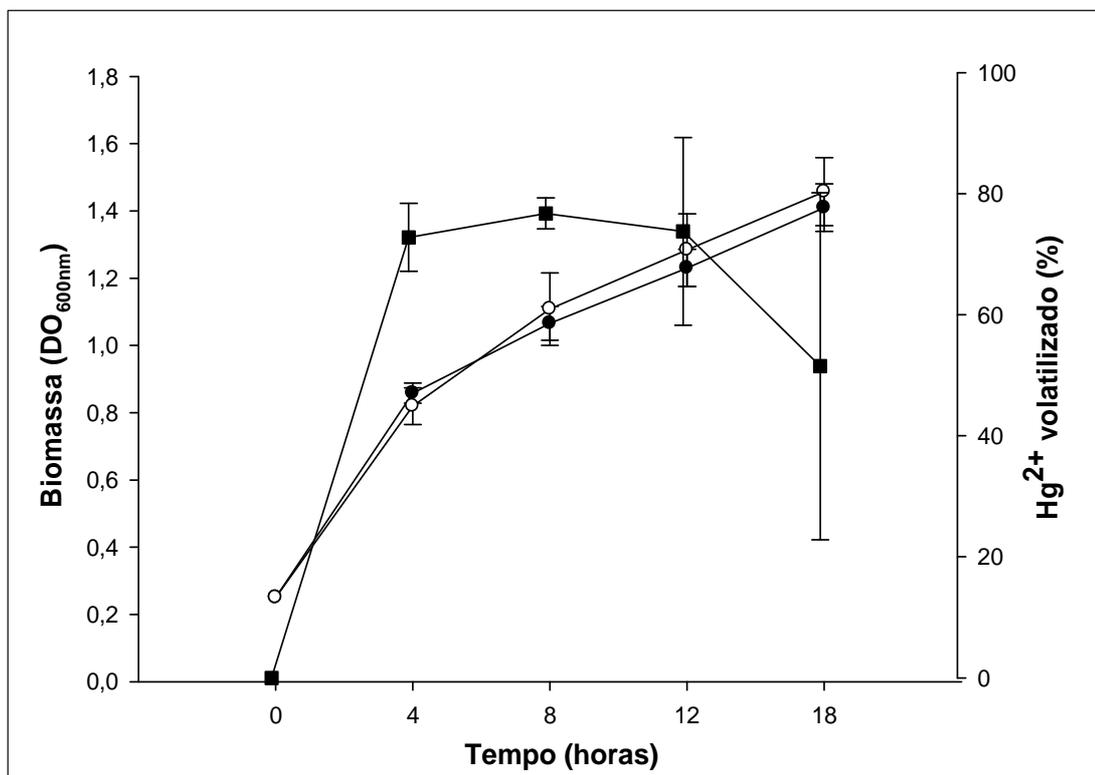


FIGURA 8. Dinâmica da volatilização de Hg^{2+} (■) e crescimento na presença (2 mg L^{-1}) (○) e ausência (●) (*Proteus mirabilis* M50C). Pontos representam a média de três repetições e as barras o erro padrão.

Os resultados deste ensaio para o isolado M50C foram ambíguos, pois na primeira avaliação de Hg remanescente às 4 horas de incubação, ele apresentou uma remoção de 72% do mercúrio e, às 8 horas de incubação, 76%. Entretanto, na terceira e quarta avaliações de mercúrio remanescente, os resultados foram opostos aos esperados, pois houve um aumento na concentração de mercúrio remanescente no meio de cultura. É importante ressaltar as barras de erro padrão das médias das repetições nessa fase do experimento, que mostram a diferença de mercúrio volatilizado entre as três repetições. Assim, concluímos que neste experimento pode ter ocorrido

contaminação dos frascos que foram utilizados para a digestão das amostras. Por isso, futuramente o ensaio será realizado novamente.

4.4 Caracterização da mercúrio redutase de *Pseudomonas sp.*

B50A no extrato bruto

O tempo necessário de incubação do isolado B50A para obtenção de máxima atividade enzimática no extrato bruto foi verificada após a incubação do microrganismo por 24 e 48 horas. A atividade enzimática não diferiu em função do tempo ($p < 0,05$) (Figura 9).

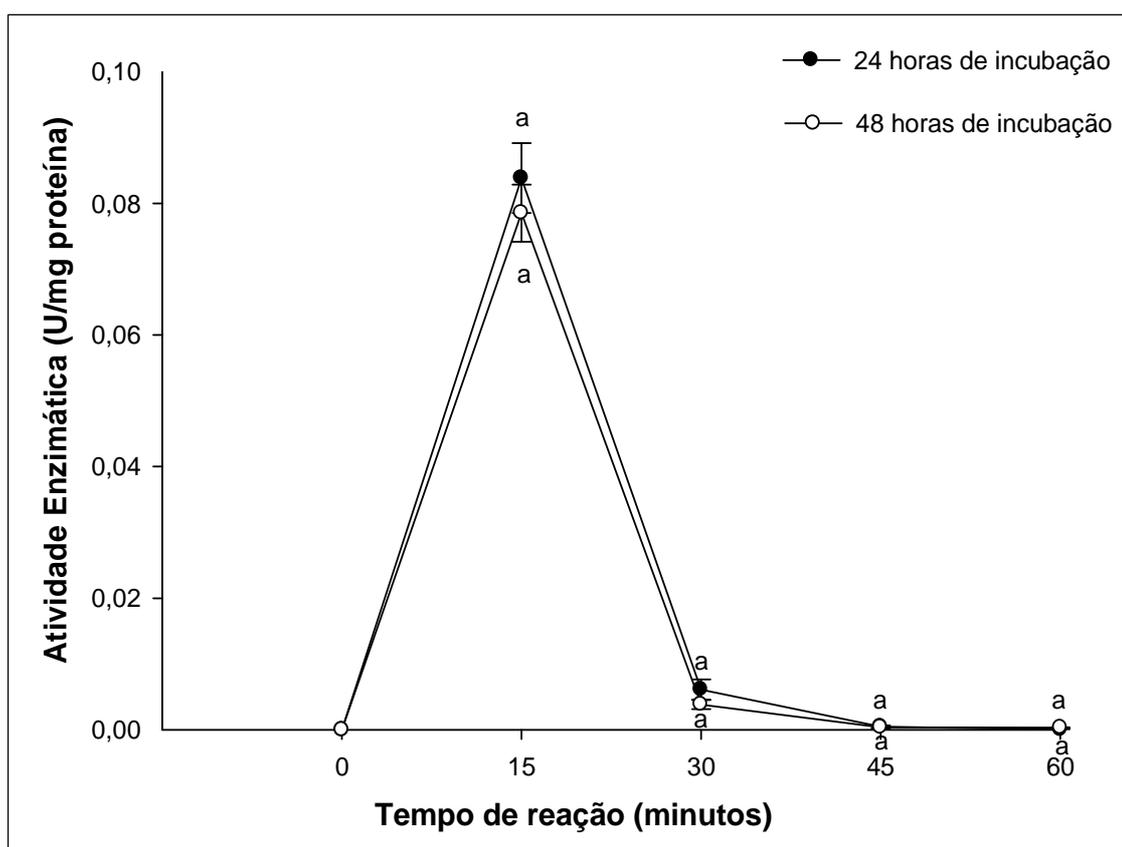


FIGURA 9. Atividade da mercúrio redutase presente no extrato bruto em diferentes tempos de reação, após 24 e 48 horas de incubação a 30°C. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre tempos de reação ($p < 0,05$).

Isto pode ser explicado pelos resultados obtidos no ensaio da volatilização por este microrganismo. O isolado B50A foi capaz de volatilizar aproximadamente 100% do Hg presente no meio de cultivo (2 mg L^{-1}) em 24 horas. Como o operon *mer* não apresenta expressão constitutiva, e sim induzida pela presença do mercúrio no meio de cultivo (Brawn et al., 2003), pode-se supor que o sistema de produção da enzima MerA foi reprimido pela deficiência de Hg no meio de cultura.

Para determinar qual o volume de extrato bruto (EB) se mostraria mais adequado, foram utilizadas diferentes quantidades de extrato bruto de B50A (200, 300 e 400 μL) na reação. Esse ensaio foi necessário para conhecer qual o momento ideal de leitura da queda da absorbância para que a atividade fosse mensurada e determinar o tempo necessário para o substrato ser convertido em produto. A atividade enzimática da MerA é medida pela queda da absorbância a 340 nm, devido a transformação da forma reduzida de NADH a oxidada NAD^+ . Para isso, as leituras de decréscimo de absorbância a 340 nm foram realizadas nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 min.

Foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a atividade enzimática apresentada com 200 μL de EB e os volumes maiores (Figura 10). Esse resultado pode ser devido ao déficit de NADH, cofatores e substrato quando na presença de maiores quantidades de enzima na reação. É possível ainda que em quantidades maiores de EB ocorra maior número de inibidores no extrato bruto. Nos dois ensaios realizados, observou-se que o tempo de reação mais adequado para estimar o ápice de atividade enzimática foi aos 15 min (Figura 9 e 10).

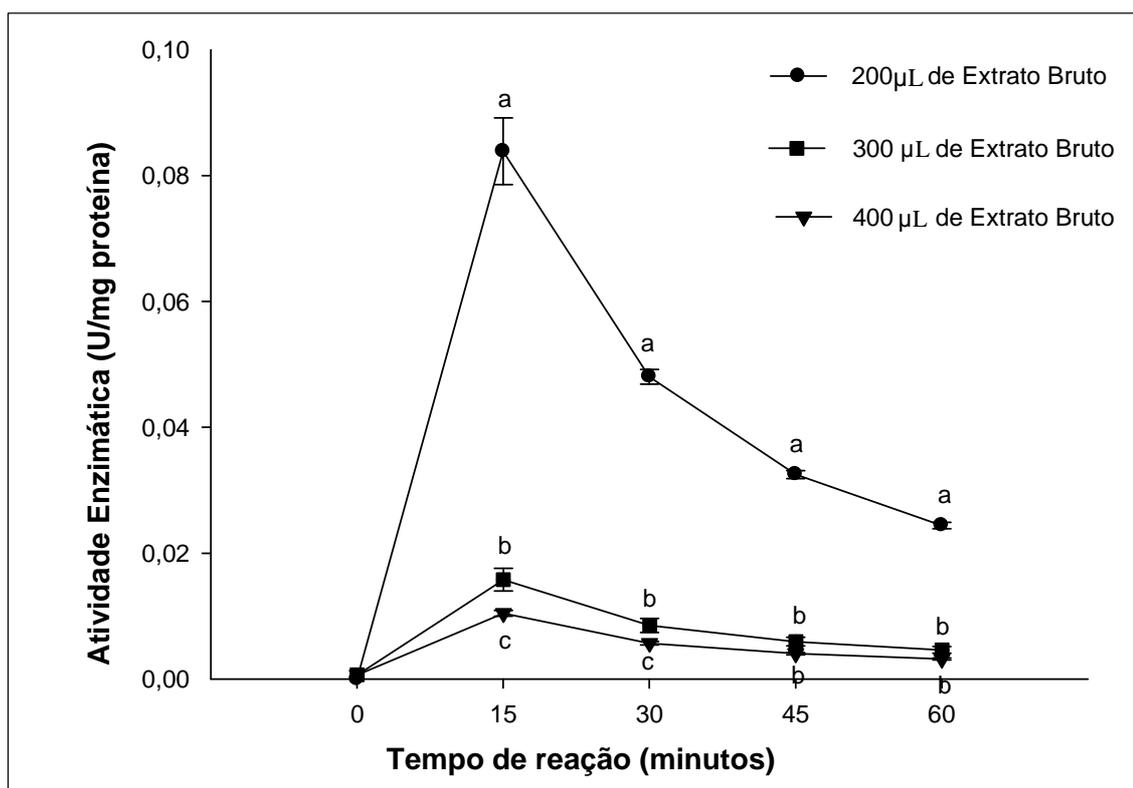


FIGURA 10. Efeito do aumento da quantidade de extrato bruto sobre a atividade enzimática em diferentes tempos de reação. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre tempos de reação ($p < 0,05$).

O aumento da temperatura apresentou efeito positivo sobre a atividade enzimática (Figura 11). Acima de 45°C foi observado efeito negativo, o que sugere desnaturação da enzima. O aumento na atividade enzimática que ocorreu até 45°C pode ser devido à atividade catalítica das enzimas que são altamente dependentes da temperatura (Lehninger, 1995). Tem sido demonstrado que as enzimas mercúrio redutases de bactérias Gram-negativas são estáveis a altas temperaturas (Izaki, 1977; Olson et al., 1982). No presente estudo a temperatura ótima variou entre 37 e 45°C.

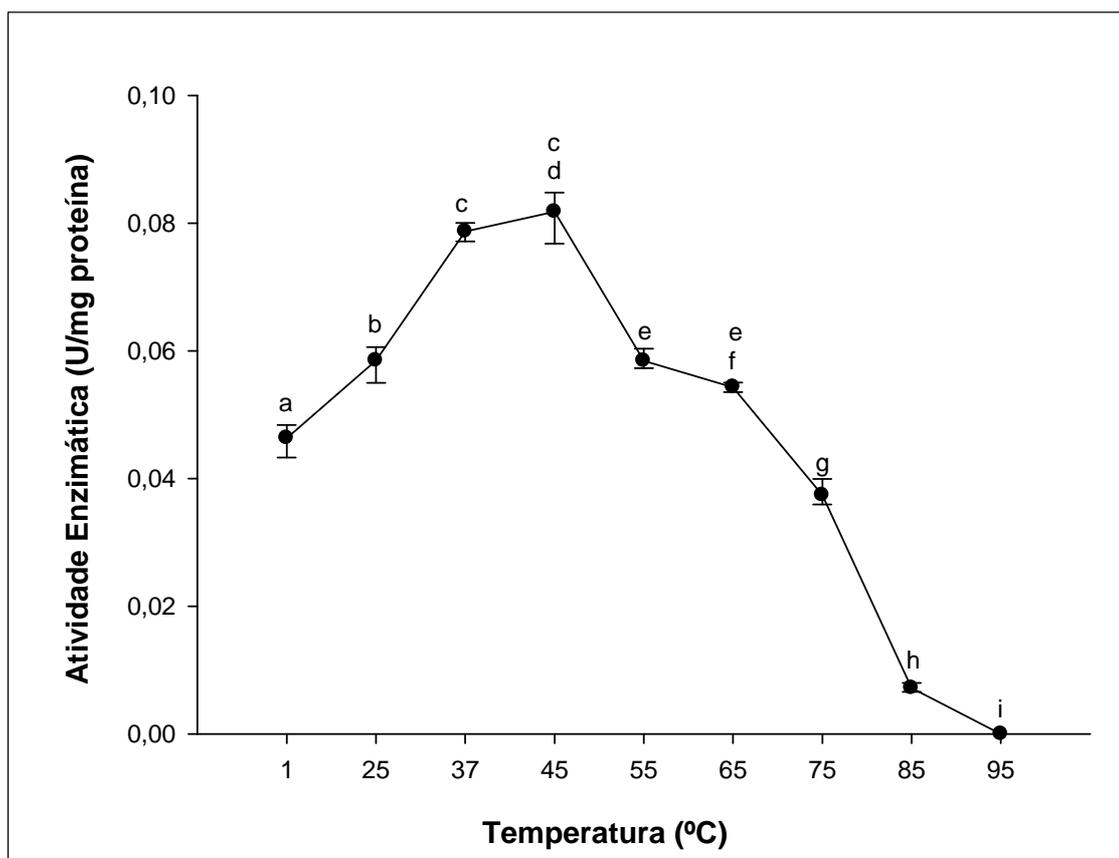


FIGURA 11. Efeito da variação da temperatura sobre a atividade da enzima mercúrio redutase presente no extrato bruto. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre temperatura ($p < 0,05$).

A enzima demonstrou maior atividade entre os pH 6 a 8, sendo que atividade máxima ocorreu em pH 8 (Figura 12). Estes resultados são concordantes com os de outros autores (Olson et al, 1982; Zeroual et al., 2003), quando avaliaram microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos respectivamente. O aumento do pH para o limite superior (8,0) resultou em aumento da atividade enzimática, indicando que valores de pHs mais alcalinos são mais apropriados para o desempenho desta enzima. Os efeitos do pH sobre as enzimas devem-se às variações no estado de ionização dos

componentes do sistema à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas e contêm muitos grupos ionizáveis, existem em diferentes estados de ionização e a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH (Lehninger, 2005).

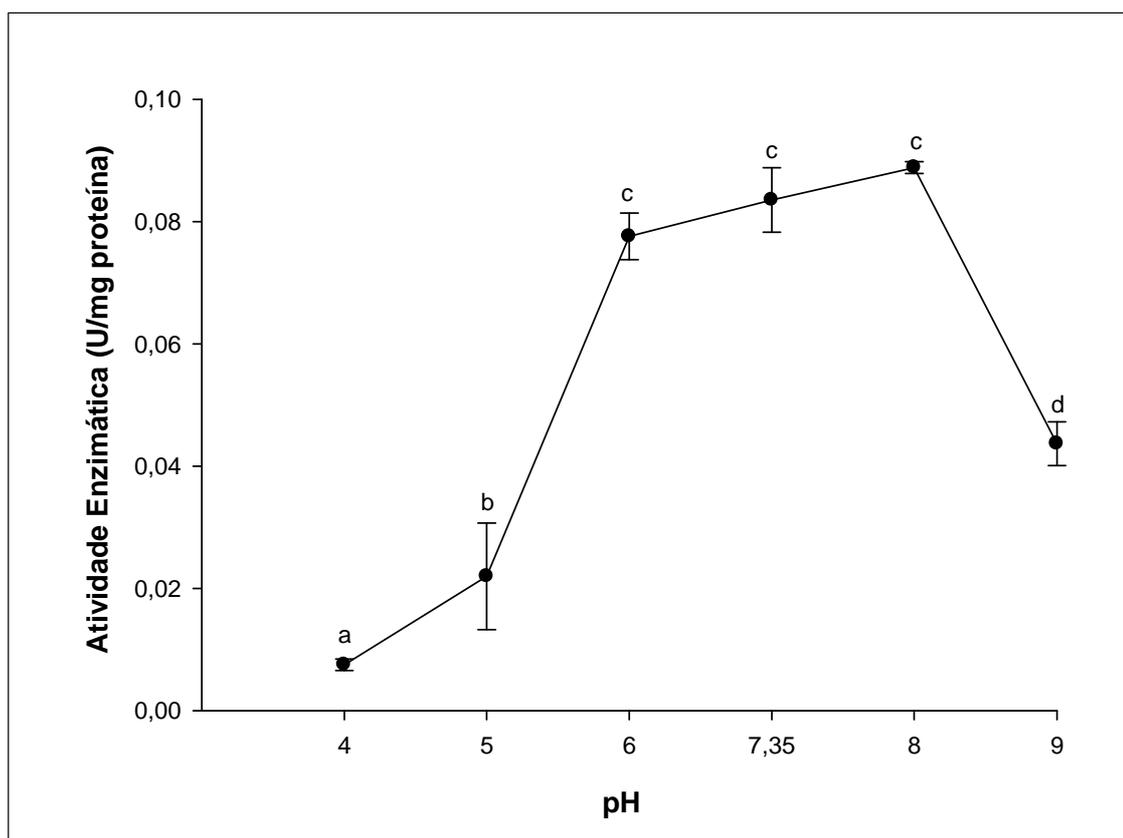


FIGURA 12. Efeito do pH do meio de reação sobre a atividade da enzima mercúrio redutase presente no extrato bruto. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre pH ($p < 0,05$).

A enzima mercúrio redutase de B50A não é inibida ou estimulada pelos íons Ni^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} , NH_4^+ (Figura 13). A enzima foi significativamente sensível ao cálcio, potássio e cobre ($p < 0,05$), porém nenhum destes íons foi capaz de inativar a enzima completamente. É possível que

tenha ocorrido a ligação destes íons com um grupo funcional essencial da mercúrio redutase, resultando numa mudança conformacional ou apenas ocupando o sítio ativo. No estudo de Ray et al. (1993) o cobre, níquel e cádmio presentes em concentrações dez vezes menores que as utilizadas nesse estudo inibiram aproximadamente 100% da atividade enzimática. Por outro lado, Gachui (1997) não constatou queda de atividade enzimática na redutase estudada após a adição de níquel e cádmio, ao contrário do cálcio e cobre que inibiram parcialmente a enzima estudada.

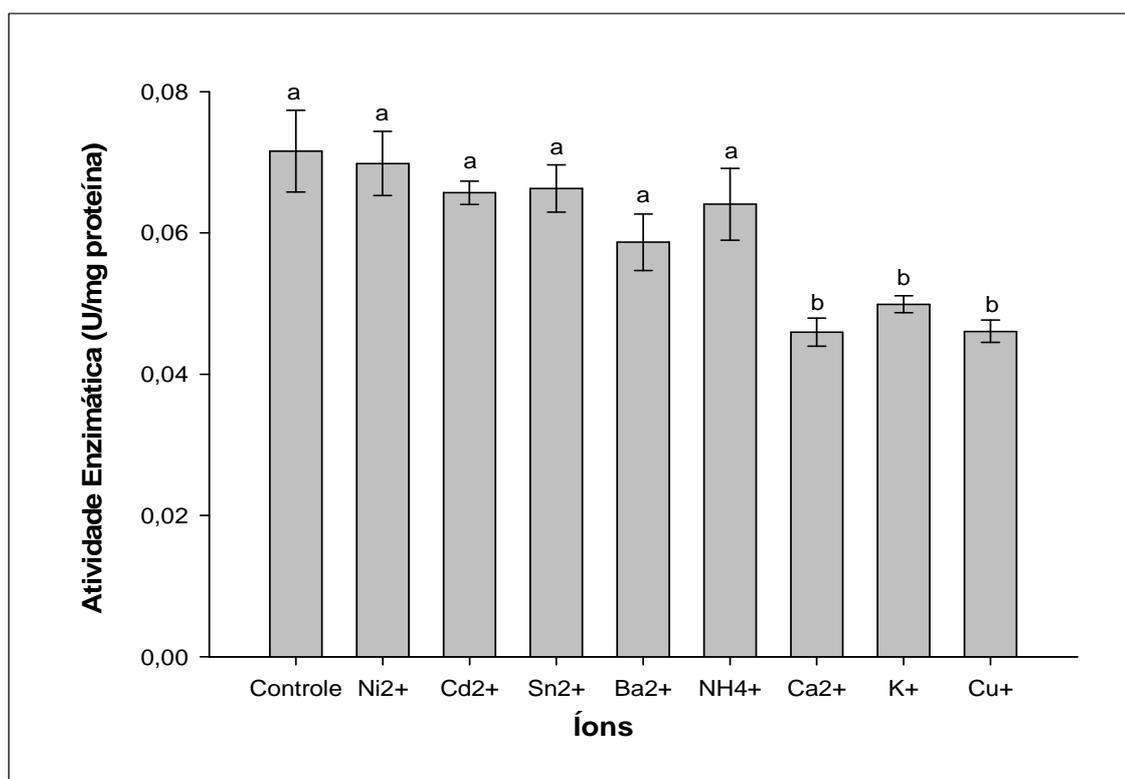


FIGURA 13. Efeito de íons sobre a atividade da enzima mercúrio redutase presente no extrato bruto. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre íons ($p < 0,05$).

Para verificar o efeito da concentração de mercúrio na atividade enzimática da mercúrio redutase do isolado B50A, diferentes concentrações de

mercúrio na forma de HgCl_2 (0, 30, 60, 90, 120 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram adicionadas ao meio reacional (Figura 14).

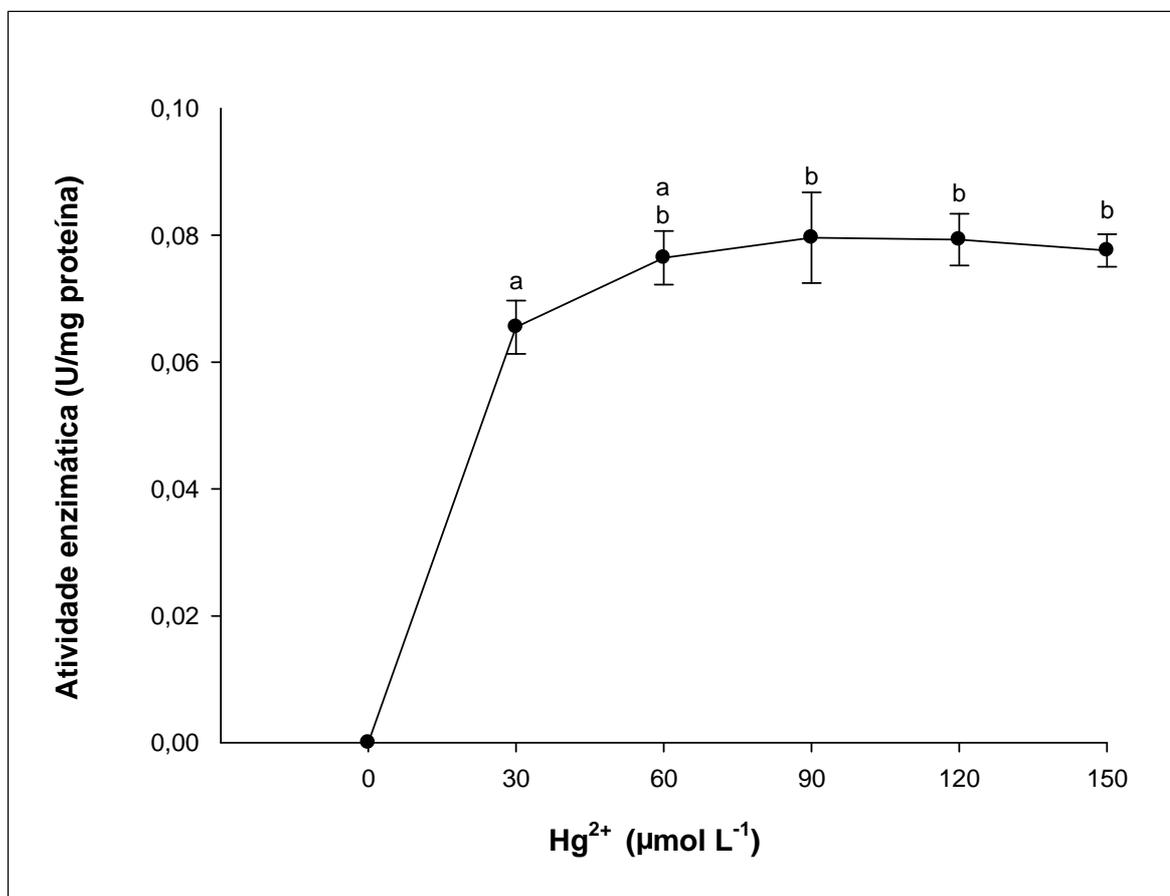


FIGURA 14. Efeito do aumento da concentração do substrato (Hg^{2+}) como indutor de atividade da mercúrio redutase presente no extrato bruto. Pontos representam a média de três repetições, as barras o erro padrão e médias com letras iguais não diferem entre concentrações de Hg ($p < 0,05$).

O uso de concentrações superiores a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg (figura 14) causou aumento na atividade da mercúrio redutase. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas ao compararmos a mais baixa concentração testada (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$), com concentrações maiores que 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estes resultados indicam que nas condições avaliadas, as concentrações entre 60 e

90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de mercúrio já seriam suficientes para a atividade máxima da enzima, pois a partir destas concentrações ocorreu uma estabilização na taxa de reação. Os parâmetros cinéticos do extrato bruto da mercúrio redutase foram obtidos diretamente pelo ajuste dos resultados da atividade da enzima *versus* concentração de mercúrio, utilizando-se a equação hiperbólica de Michaelis-Menten. Verificou-se que a equação se ajustou adequadamente aos dados ($r^2=0,98$) e que o V_{max} foi de $0,0845 \mu\text{mol min}^{-1}$ e que o K_m foi de $0,718 \mu\text{mol L}^{-1}$.

5. CONCLUSÕES

- Foram isolados dezesseis microrganismos resistentes ao mercúrio, sendo o gênero *Pseudomonas* o mais frequente, representando 62,5% dos isolados, seguido do gênero *Enterobacter* com frequência de 25%;

- Todos os isolados apresentam alta resistência ao mercúrio e alta capacidade de o volatilizarem;

- A capacidade dos microrganismos de volatilizarem o mercúrio não está relacionada a altas concentrações inibitórias mínimas, mas é afetada por concentrações subletais de Hg;

- A ampliação do tempo de incubação de *Pseudomonas* sp. B50A, não afeta positivamente a atividade da mercúrio redutase deste microrganismo;

- A mercúrio redutase produzida pela *Pseudomonas* sp. B50A apresenta atividade ótima nas temperaturas entre 37 e 45°C, pH 8 e é inibida pelos íons Ca^{2+} , K^+ e Cu^+ nas concentrações utilizadas, e não é inibida ou estimulada pelos íons Ni^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} , NH_4^+ .

- As bactérias isoladas e a enzima mercúrio redutase são eficientes na redução de Hg (II) a Hg^0 , o que evidencia o potencial destes microrganismos para o desenvolvimento de tecnologias que visam a remediação de resíduos contaminados com mercúrio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENIJI, A. Bioremediation of arsenic, chromium, lead, and mercury. National Network of Environmental Management Studies Fellow for U.S. **Environmental Protection Agency Washington**, Washington, DC, 2004, 43p.

ALEXANDRE, S. C. **Avaliação de área contaminada por mercúrio total em Descoberto - Minas Gerais**. 2006. 63p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio**, RIMA, São Paulo, 2003, 292p.

BALL, M. M. Mercury Resistance in Bacterial Strains Isolated from Tailing Ponds in a Gold Mining Area Near El Callao (Bolívar State, Venezuela). **Current Microbiology**, v. 54, p. 149-154, 2007.

BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. O Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, 355-384, 2003.

BARKAY, T; WAGNERDOBLER, I. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. **Advances in Applied Microbiology**, v. 57, p. 1-52, 2005.

BIESTER, H.; GOSAR, M.; MULLER, G. Mercury speciation in tailings of the Idrija mercury mine. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 65, n. 3, p. 195-204, 1999.

BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 593-600, 2004.

BROW, N. L. et al. Mercury transport and resistance. **Biochemical Society**, v. 30, 715-718, 2002.

BROW, N. L. et al. The MerR family of transcriptional regulators. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, v. 145–163, 2003.

CAMARGO, F. A. O. et al. Uso de microrganismos para remediação de metais. (Ed) **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.5, p.468- 496, 2007.

CANSTEIN, H. et al. Removal of Mercury from Chloralkali Electrolysis Wastewater by a Mercury-Resistant *Pseudomonas putida* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5279-5284, 1999.

CHADHAIN, S. M. N. et al. Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 10, 1746–1752, 2006.

CHAMPIER, L. et al. Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidumns* CH34: A possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the mer operon. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 1475-1485, 2004.

CHATZIEFTHIMIOU, A. D. et al. The isolation and initial characterization of mercury resistant chemolithotrophic thermophilic bacteria from mercury rich geothermal springs. **Extremophiles**, v. 11, p. 469-479, 2007

CLARKSON, T. The Three Modern Faces of Mercury. **Environ Health Perspect**, v. 110, p. 11-23, 2002.

ENGST, S.; MILLER, S. M. Alternative routes for entry of HgX_2 into the active site of mercuric ion reductase depend on the nature of the X ligands. **Biochemistry**, v. 38, p. 3519-3529, 1999.

ERBE, J. L.; TAYLOR, K. B.; HALL, L. M. Metalloregulation of the cyanobacterial *smt* locus: identification of the *smtB* binding sites and direct interaction with metals. **Nucleic Acids Research**, v. 23 p. 2472–2478, 1995.

FORTUNATO, R.; CRESPO, J. G.; REIS, M. A. M. Biodegradation of thiomersal containing effluents by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain. **Water Research**, v. 39, p. 3511–3522, 2005.

GACHHUY, J. R. et al. Studies on Mercury-detoxicating Enzymes from a Broad-Spectrum Mercury-Resistant Strain of *Flavobacterium rigense*. **Folia Microbiol**, v. 42, p. 337-343, 1997.

GHOSH, S. et al. Studies on the effect of mercury and organomercurial on the growth and nitrogen fixation by mercury-resistant *Azotobacter* strains. **Journal of Applied microbiology**, v. 80, n. 3, p. 319-326, 1995.

GHOSH, S. et al. Elimination of Mercury and Organomercurials by Nitrogen-Fixing Bacteria. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 58, p. 993-998, 1997.

GRIFFIN, H. G. et al. Molecular Analysis of Multiple-Resistance Plasmids Transferred from Gram-Negative Bacteria Isolated in a Urological Unit. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 3, p. 413-418, 1985.

HENRIETTE, C. et al. Mercuric reductase activity in the adaptation to cationic mercury, phenyl mercuric acetate and multiple antibiotics of a Gram-negative population isolated from an aerobic fixed-bed reactor. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 439-444, 1991.

HORN, J. M. et al. *Pseudomonas putida* Strains Which Constitutively Overexpress Mercury Resistance for Biodegradation of Organomercurial Pollutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 357–362, 1994.

IPCS – International Programme on Chemical Safety. **Environmental Health Criteria: 118 Inorganic Mercury** disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc118.htm>. acesso em Janeiro, 2010.

KANNAN, S. K.; KRISHNAMOORTHY, R. Isolation of mercury resistant bacteria and influence of abiotic factors on bioavailability of mercury — A case study in Pulicat Lake North of Chennai, South East India. **Science of the Total Environment**, v. 367, p. 341–353, 2006.

KANNAN, S. K.; MAHADEVAN, S., KRISHNAMOORTHY R. Characterization of a mercury-reducing *Bacillus cereus* strain isolated from the Pulicat Lake sediments, south east coast of India. **Arch Microbiol**, v. 185 p. 202–211, 2006.

KAZUO, I. Enzymatic Reduction of Mercurous Ions in *Escherichia coli* Bearing R Factor. **Journal of Bacteriology**, v. 132, n. 2, p. 696-698, 1977.

LACERDA, L. D.; MARINS, R. V. Anthropogenic mercury emissions to the atmosphere in Brazil: The impact of gold mining. **Journal of Geochemical Exploration**, v.58, n. 2-3, p. 223-229, 1997.

LACERDA, L.D. et al. **Mercúrio em solos e sedimentos lacustres na região de Alta Floresta, MT**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, Série Tecnologia Ambiental; v. 23, 1999.

LEHNINGER, A.L. et al. **Principles of biochemistry**. 2 ed. New York: Worth Publishers, 1995. 839p.

LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MALM, O. **Contaminação ambiental e humana por mercúrio na região garimpeira de ouro do Rio Madeira, Amazônia**. 1991. 106f. Tese de Doutorado – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1991.

MELAMED, R; VILLAS BÔAS, R. C. **Mecanismos de interação físico-química e mobilidade do mercúrio em solos, sedimentos e rejeitos de garimpo de ouro.** Rio de Janeiro: CETEM/MCT, Série Tecnologia Ambiental; V. 25, 2002.

MICARONI, R. C.; BUENO, M. I.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio: Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000.

MIRZAEI, N.; KAFILZADEH, F.;KARGAR, M. Isolation and identification of mercury resistant bacteria from Kor river, Iran. **Journal of Biological Sciences**,v. 8, n. 5, p. 935-939, 2008.

MORTAZAVI, S. et al. Removal of Mercuric Chloride by a Mercury Resistant *Pseudomonas putida* Strain. **Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 269-273, 2005.

MUNTHE, J.; XIAO, Z. F.; LINDQVIST, O. The aqueous reduction of divalent mercury by sulfite. **Water, Air, & Soil Pollution**. v. 56, n. 1, p. 621-630, 1991.

NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos.** Série Cadernos de Referência Ambiental v. 1. – Salvador: CRA, 2001.

NAKAMURA, K.; FUJISAKI, T.; YOSHISADA, S. Mercury-Resistant bacteria in sediment of Minamata Bay. **Nippon Suisan Gakkaishi: Formerly Bull. Japan. Soc. Sci. Fish**, v. 54, n. 8, p. 1359-1363, 1988.

NAKAMURA, K.; IWAHARA, M.; FURUKAMA, K. Screening of organomercurial-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediments and seawater of Minamata Bay in Japan. **Clean Prod. Processes**, v. 3, p. 104-107, 2001.

OLSON, G. J. et al. Mercuric reductase enzyme from a mercury-volatilizing strain of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriol.**, v. 151, p. 1230-1236, 1982.

PICAZO, J.E.; FERNANDEZ, J.M. **Fuentes Naturales y Antropogénicas de los Mercuriales.** Disponível em: <http://www.actualidaddermatol.com/art3295.pdf> Acesso em: jan. 2010.

PIRRONE, N. et al. Ambient Air Pollution by Mercury (Hg). Position Paper. Luxembourg, **Office for Official Publications of the European Communities**, 235 p, 2001.

PIRRONE, N.; MAHAFFEY, K. R. **Dynamics of mercury pollution on regional and global scales : atmospheric processes and human exposures around the world**, New York, 739 p, 2005.

RAY, S. et al. Studies on the mercury volatilizing enzymes in nitrogen-fixing *Beijerinckia mobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 184-186, 1993.

SADHUKHAN, P. C. et al. Mercury and Organomercurial Resistance in Bacteria Isolated From Freshwater Fish of Wetland Fisheries Around Calcutta. **Environmental Pollution**, v. 97, n. 1-2, p. 71-78, 1997.

SILVER, S.; HOBMAN, J. L. Mercury Microbiology: Resistance Systems, Environmental Aspects, Methylation, and Human Health. **Microbiology Monographs**, v. 6, p. 357-370, 2007.

UNEP. United Nations Environment Programme: Chemicals. **Global Mercury Assessment**, Geneva, 270 p, 2002.

VERA, Y. M. **Predição da concentração de mercúrio em Tucunaré usando modelos de balanço de massa e bioenergético**. 2004. 111p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

VERBEL, J. O.; RESTREPO, B. J. **El lado gris de la minería del oro: La contaminación con mercurio en el norte de Colombia**, Colombia, 123 p, 2002.

VETRIANI, C. et al., Mercury Adaptation among Bacteria from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1:, p. 220–226, 2005.

WANG, Y. et al. An initial characterization of the mercury resistance (mer) system of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. **FEMS Microbiology Ecology**, V. 67, p. 118–129, 2009.

WILHELM, S. M.; BLOOM, N. Mercury in petroleum. **Fuel Proc. Technol**, v. 63, n. 1, p. 1-27, 2000.

WHO – World Health Organization. **Mercury: Environmental Health Criteria**, Geneva, v. 86. 115 p., 1989.

WHO – World Health Organization. **Methylmercury: Environmental Health Criteria**, Geneva, p. 101-144, 1990.

WHO – Health Organization. **Inorganic mercury: Environmental Health Criteria**, Geneva, p 118-105, 1991.

ZHAN, L.; PLANAS, D. Biotic and abiotic mercury methylation and demethylation in sediments. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 52, p. 691-698, 1994.